

Douglas Magalhães de Paula

**Avaliação da Biocompatibilidade, por meio de
implantes intra ósseos, a 4 tipos de MTAs: um
estudo *in vivo***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Odontologia, da Faculdade de
Odontologia, da Universidade de
Uberlândia, para obtenção do Título
de Mestre em Clínica Odontológica
Integrada.

Uberlândia, 2012

Douglas Magalhães de Paula

**Avaliação da Biocompatibilidade, por meio de
implantes intra ósseos, a 4 tipos de MTAs: um
estudo *in vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação da Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do Título de
Mestre em Clínica Odontológica
Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Cássio José Alves Sousa

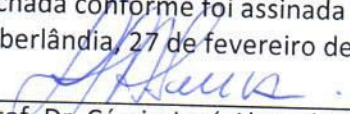
Uberlândia, 2012



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA 225ª DEFESA DE MESTRADO DO (A) CD DOUGLAS MAGALHÃES DE PAULA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

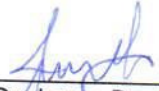
Às quatorze horas do dia vinte e sete de fevereiro do ano de dois mil e doze, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento da Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno (a) DOUGLAS MAGALHÃES DE PAULA com o título *Avaliação da biocompatibilidade de materiais intra ósseos, a 4 tipos de MTAs: um estudo in vivo*. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Dissertações e Teses da Biblioteca desta Universidade. Acompanham este relatório os pareceres individuais dos membros da Comissão Julgadora. Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 17 horas e _____ minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.
Uberlândia, 27 de fevereiro de 2012



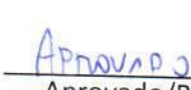
Prof. Dr. Cassio José Alves de Sousa
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia – UFU



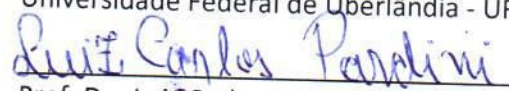
Aprovado/Reprovado



Prof. Dr. Jonas Dantas Batista
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia - UFU



Aprovado/Reprovado



Prof. Dr. Luis Carlos Pardini
Titulação: Doutor
Universidade de São Paulo - FORP/ USP



Aprovado/Reprovado

DEDICATÓRIA

Dedico a **DEUS**, por sua presença ao longo desta jornada, pela força e conforto que me concedeu nos momentos difíceis. Agradeço pela oportunidade da vida, e por todos que dela participam.

Aos **meus pais**, sempre presentes nos momentos mais importantes de minha vida, sendo o meu esteio e minha força motriz.

À minha namorada, **Cristiane**, pelo carinho e companheirismo nessa caminhada.

Em especial à memória de meu irmão, **Diogo**, que certamente de onde estiver me transmite a força necessária para superar a dor de sua ausência.

AGRADECIMENTO

- Agradeço ao meu orientador, **Prof. Dr. Cássio José Alves de Sousa**, por dispor de seus conhecimentos e pela atenção e orientação não minha formação acadêmica. Minha admiração e eterna gratidão.
- À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia
- Ao Programa de Pós-Graduação na pessoa de seu atual coordenador Prof Dr. **Flávio Domingues das Neves**.
- Aos meus amigos de curso, em especial **Marcos Pains, Marcos Bilharinho e Andréia Lacativa** pela amizade fraternal, vocês souberam dar apoio e coragem ao longo de todo este projeto.
- Aos funcionários da Pós-graduação FOUFU, pelo auxílio nas questões burocráticas.
- A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISAO DE LITERATURA.....	16
3 PROPOSIÇÃO	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1 Materiais testados.....	46
4.2 Implantes Intra-ósseo.....	46
4.3 Procedimento Laboratorial.....	49
4.3.1 Preparo histológico	49
4.3.2 Critério histológico.....	49
4.3.3 Requisitos histológicos.....	51
4.3.3.1 Critério de Avaliação	51
4.3.3.2 Interpretação	52
5 RESULTADOS.....	53
5.1 Controle Negativo – Zona de Teflon®.....	53
5.2 Avaliação de biocompatibilidade dos MTA's.....	53
5.3 Avaliação histológica dos MTA's.....	54

5.4	Avaliação da resposta inflamatória.....	56
5.4.1	Avaliação de 4 semanas - MTA - Branco Ângelus® e MTA – Cinza Ângelus®	56
5.4.2	Avaliação de 4 semanas - MTA - Branco ProRoot® e MTA – Cinza ProRoot®	56
5.4.3	Avaliação de 12 semanas - MTA – Branco Ângelus® e MTA – Cinza Ângelus®	56
5.4.4	Avaliação de 12 semanas - MTA – Branco ProRoot® e MTA – Cinza ProRoot®	57
6	DISCUSSÃO.....	66
6.1	Metodologia	66
6.2	Resultados	69
7	CONCLUSÃO.....	71
8	REFERÊNCIAS	72
	ANEXOS.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MTA	Mineral Trióxido Agregado
HC	Hidróxido de Cálcio
mm	Milímetros
mg	Miligrama
L	Litro
ml	Mililitros
kg	kilograma
°C	Graus Celsius
µm	Micrometro
µl	Microlitro
MPa	MegaPaschal
rpm	Rotação por minuto
ANSA	Agência americana de normas e padronizações
ADA	Associação Dentária Americana
FDI	Federação Dentária Internacional
FDA	Food and Drug Administration
Rx	Raio “X”
IL	Interleucina
HBSS	Solução salina de Hank balanceada
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Período experimental e número de implantes intra-ósseo	54
TABELA 2	Número de implantes intra ósseos e intensidade da resposta inflamatória verificada	54
TABELA 3	Análise histológica dos materiais testados em 4 semanas e 12 semanas	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Ilustração da metodologia de implante intra ósseo	48
FIGURA 2	MTA – Ângelus Branco® – 4 semanas	58
FIGURA 3	MTA – Ângelus Branco® – 12 semanas	59
FIGURA 4	MTA – Ângelus Cinza® – 4 semanas	60
FIGURA 5	MTA – Ângelus Cinza® – 12 semanas	61
FIGURA 6	MTA – ProRoot Branco® – 4 semanas	62
FIGURA 7	MTA – ProRoot Branco® – 12 semanas	63
FIGURA 8	MTA – ProRoot Cinza® – 4 semanas	64
FIGURA 9	MTA – ProRoot Cinza® – 12 semanas	65

RESUMO

O material utilizado na retro-obturação é, entre outros, um fator determinante do sucesso na cirurgia paraendodôntica, dessa forma estes devem ter investigadas suas características de biocompatibilidade uma vez que permanecem em contato direto com o tecido ósseo periapical. Neste estudo, investigou-se a resposta inflamatória do tecido ósseo frente aos quatro tipos de MTAs disponíveis no mercado, através de implantes intra ósseos em cobaias *guinea pigs*, usando para isso, a metodologia recomendada pela Federação Dentária Internacional (1980) e aceita internacionalmente (ADA, 1982). Quarenta cobaias foram utilizadas nos períodos experimentais de quatro e doze semanas. Cada animal recebeu um implante em cada lado da região sinfisária da mandíbula. De cada implante foram confeccionadas 24 lâminas com 144 cortes histológicos, coradas com hematoxilina-eosina e analisadas por dois observadores independentes. Verificou-se similaridade entre os materiais testados, uma vez que em todos os períodos de avaliação, tanto os MTAs ProRoot® cinza e branco quanto os MTAs Ângelus® cinza e branco apresentaram uma reação inflamatória ausentes/suaves evoluindo para um processo de reparo cicatricial com aposição de matriz mineralizada. Assim, através da metodologia empregada foi possível concluir que todos os tipos de MTAs, independentemente da marca comercial, foram biocompatíveis promovendo resposta tecidual similar quando em contato com o tecido ósseo.

Palavras Chaves: cirurgia paraendodôntica, biocompatibilidade, mineral trioxide agregado

ABSTRACT

The material used in retrofilling is among others a decisive factor for the success in parendodontic surgeries; therefore they should have investigated their biocompatible characteristics since they remain in direct contact with the periapical bone tissue. This study investigated the inflammatory response of bone tissue when in contact with four types of MTAs available on the market, through intraosseous implants in guinea pigs, using for that purpose, the methodology recommended by the International Dental Federation (1980) which is internationally accepted (ADA, 1982). Forty guinea pigs were used in experimental periods of four and twelve weeks. Each animal received an implant in each side of the mandibular symphysis region. From each implant it was made 24 blades with 144 histological cuts, stained with hematoxylin-eosin and reviewed by two independent observers. There was similarity between the materials tested, since after 4 weeks all the implants with MTAs ProRoot® gray and white as well as the ones with MTAs Angelus® gray and white presented an absent/mild inflammatory reaction evolving into a process of scar repair with affixing of mineralized matrix. Thus, through the methodology employed it was possible to conclude that all types of MTAs, regardless the trademark, were biocompatible promoting similar tissue responses when in contact with the bone tissue.

Key terms: apical surgery, biocompatibility, mineral trioxide aggregate

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da produção científica da Odontologia na última década possibilita-nos a utilização de uma gama de produtos. Este desenvolvimento, tanto no campo científico quanto no tecnológico, intensifica-se com o aprimoramento dos recursos já existentes e a criação de outros novos, cujo principal objetivo é a preservação do elemento dental, permitindo o exercício de suas funções de modo adequado.

Como elemento integrante deste processo evolutivo, a Endodontia - uma das especialidades da Odontologia que se dedica ao estudo da anatomia, função, fisiologia e terapia das afecções dos tecidos pulpare e apicais do dente - passa de uma fase empírica para outra embasada em evidências científicas e, contribuindo para com o retorno do elemento dentário às suas funções originais, reintegra-o ao sistema estomatognático, exigindo, porém, condições que viabilizem o maior respeito à região apical e aos tecidos circunjacentes.

Nesse contexto, o ensino da Endodontia estabelece que o sucesso da terapêutica depende da completa remoção do conteúdo asséptico ou séptico do sistema de canais radiculares, seguido de suas obturações com um material possuidor de propriedades físicas adequadas e que seja biocompatível, evitando agressões aos remanescentes pulpare da região apical e aos tecidos periapicais. Em alguns casos, estes canais não podem ser adequadamente tratados, devido à complexidade de sua anatomia ou às dificuldades relacionadas com a técnica, sendo indicado o retratamento como uma possibilidade terapêutica, ou ainda, a realização de uma cirurgia parendodôntica. Esse procedimento inclui exposição cirúrgica do ápice comprometido, amputação do mesmo, preparo cavitário e retro-obturação do canal radicular com um material específico. (Gartner & Dorn, 1992; Bernabé & Holland, 2004; Hellwig, et.al. 2007).

O material utilizado na retro-obturação é, entre outros, um fator determinante do sucesso na cirurgia parendodôntica; dessa forma, uma variedade de materiais foi preconizada para tal finalidade até o início da década de 90, tais como os cimentos à base de hidróxido de cálcio, amálgama, IRM, ZOE e ionômero de vidro. Estes materiais deveriam apresentar algumas características e propriedades físico-químicas como trabalhabilidade, estabilidade dimensional, tempo de presa, radiopacidade, capacidade de selamento e baixa solubilidade aos fluidos teciduais, além de características biológicas como biocompatibilidade, potencial de promover regeneração tecidual e ser antimicrobiano. (Torabinejad & Pitt Ford, 1996; Holt & Dumsha, 2000; Souza et al, 2004; Santos, 2004).

Nenhum destes produtos, porém, consegue abranger todas estas características e propriedades. Em 1993, Lee et.al. reportaram, pela primeira vez, sobre um novo material selador endodôntico intitulado “Mineral Trioxide Aggregate” (MTA), possuidor da maioria destas propriedades. Este material foi desenvolvido por Mohamoud Torabinejad, na Universidade Loma Linda (U.S.A.), o qual apresentou, no mesmo ano, um estudo em dentes humanos, mostrando um selamento apical hermético superior aos resultados apresentados quando utilizados outros materiais. (Santos, 2004)

A partir deste trabalho, surgiu uma série de outros estudos *in vivo* e *in vitro*, todos no sentido de avaliarem o comportamento físico e biológico do MTA (Torabinejad & Chivian, 1995; Schimitt et al 2001; Holland et al 2001; Saidon et al 2002; Tziafas et al 2003). Este material causou uma verdadeira revolução na endodontia, não apenas pelo fato de praticamente todos os estudos daquela época revelar a superioridade desse material aos demais testados, mas também pelo fato de possuir uma similaridade muito grande com cimento Portland (cimento de construção).

Em 1998 o MTA foi avaliado e aprovado pela FDA (Food and Drugs Administration), e lançado comercialmente em 1999 pela Dentsply Tulsa

Dental, Oklahoma (E.U.A.), com nome comercial de ProRoot MTA. (Swartz et al, 1999)

Na verdade, a origem e composição do MTA sempre despertaram a curiosidade no meio científico da odontologia. Esse mistério passou a ser desvendado a partir de um abstract sobre o referido material publicado por Wucherpfenning e Green em 1999. Nessa breve citação, os autores afirmaram que pela análise de difração de Rx, esse material era quase idêntico macroscopicamente e microscopicamente ao cimento Portland. Curiosamente essas observações não foram publicadas, tendo-se limitado a esse abstract. (Cardoso & Machado, 2003)

A partir desta data, muitos trabalhos, como de Estrela et.al.(2000), Holland et.al. (2001), Deal et al. (2002) e Fuentes et al (2002) constataram a similaridade levantada por Wucherpfenning.

Baseados na série de estudos realizados com MTA, associado à boa performance clínica desse cimento, o Laboratório Ângelus-Londrina – PR – Brasil, lançou no mercado em 2001 um produto similar ao ProRoot MTA®, com o nome comercial de MTA Ângelus®. Esse produto possui basicamente as mesmas características do produto americano.

O sucesso deste cimento está associado ao processo de reparo tecidual. Esse processo se deve principalmente pela presença do hidróxido de cálcio na composição do MTA. O hidróxido de cálcio, produto introduzido na odontologia pelo dentista alemão Herman em 1920, quando em contato com meio aquoso, se dissocia em íons Ca^{2+} e íons OH^- e a presença destes íons no líquido tissular parece ter relação direta com a ação antimicrobiana e formação de barreira de tecido mineralizado, que, associados, promovem o reparo tecidual. (Cardoso e Machado, 2003)

Assim, este trabalho pretende estudar o processo de reparo ósseo frente ao uso dos quatro tipos de MTA disponível no mercado, fornecendo de

forma comparativa subsídios que indiquem a escolha do material que preencha, de forma mais satisfatória, os requisitos necessários para sua utilização.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Spangberg, em 1969, introduziu um método conveniente e simples para a implantação na mandíbula de cobaias. O implante é colocado no triângulo ósseo formado entre os incisivos e a parte inferior da sínfise que une as duas metades da mandíbula. Esta área pode ser alcançada através de uma incisão extra-oral na pele e camada muscular submandibular. Quando a área é atingida, o periósteo é removido e uma cavidade é preparada em cada lado da sínfise. A cavidade deve ser preparada de maneira tal que seu tamanho final seja obtido através de brocas com diâmetros crescentes, começando com uma esférica menor, com rotação de 2.000 a 3.000 rpm, e irrigação constante com solução salina esterilizada. A broca seguinte é espiral, à qual se segue uma broca de fissura de diâmetro equivalente ao do implante. O autor desenvolveu um veículo especial feito de Teflon[®], com ranhuras externas para retenção na cavidade óssea, a fim de carregar o material a ser estudado. O veículo tem a forma de um copo, com diâmetro externo de 2 mm, interno de 1,3 mm e comprimento de 2 mm. Ao preenchê-lo com o material, deve-se tomar cuidado para não contaminar a sua superfície externa, pois a mesma serve como controle negativo da técnica. Após o preparo da cavidade, a mesma é irrigada com solução salina e o copo com o material é inserido, tendo sua abertura direcionada para o osso. Quando a cavidade foi feita apropriadamente, o copo se acomoda de maneira justa e as ranhuras se preenchem rapidamente com osso neoformado, mantendo-o em posição durante todo o experimento, independentemente das reações tissulares que possam ocorrer. Após a colocação dos implantes, os tecidos moles são reposicionados e suturados. O autor concluiu que, após a análise dos resultados, foi possível estabelecer uma classificação dos materiais em ordem crescente de toxicidade e que os resultados mostraram que o quadro histológico variava largamente entre os diferentes materiais testados, enquanto que as variações entre implantes do mesmo material eram muito pequenas.

Langeland & Cotton, em 1980, recomendam três níveis de avaliação dos materiais utilizados na terapia intrarradicular: teste inicial *in vitro*, por meio de teste em cultura de células, teste secundário em animais de pequeno porte *in vivo*, subcutâneo ou intra-ósseo e o teste de uso em primatas subumanos e humanos. Todos estes publicados como testes de biocompatibilidade recomendado pela Federação Dentária Internacional.

O documento nº 41 da ANSI/ADA, publicado em 1982, aceita e aprova as normas da FDI sobre a padronização de técnica para se avaliar a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* de materiais dentários.

Desenvolvido por Mohamoud Torabinejad, Universidade de Loma Linda. Califórnia, U.S.A., O MTA (Mineral Trióxide Aggregate) é um material obturador e retro-obturador que tem merecido destaque nas últimas décadas. O material obturador retrógrado deve permitir o selamento entre os sistemas de canais radiculares e seus tecidos circunvizinhos; além de ser atóxico, não deve possuir propriedades carcinogênicas, ser biocompatível, insolúvel em líquidos teciduais e dimensionalmente estável. O MTA foi desenvolvido e indicado como material retro obturador exatamente porque os materiais já existentes não possuem tais características ideais. Atualmente, o MTA também tem sido recomendado para capeamento pulpar, pulpotomia, apicificação, tratamento de perfuração radicular, além de material obturador radicular, sendo que desde 1993 estudos têm sido publicados sobre seus vários aspectos.

Segundo Torabinejad et al. (1993), o MTA tem uma série de vantagens sobre os outros materiais retro-obturadores, pois ele é o mais facilmente misturado e colocado nas retrocavidades com o auxílio de um pequeno porta amálgama, não necessitando de campo seco; além disso, seus excessos podem ser facilmente removidos da superfície dentária radicular com o auxílio de uma gaze umedecida. Ainda como vantagem pode-se afirmar que, devido à sua composição se basear em óxidos minerais, ele endurece ao reagir

com a água. Por apresentar tais características hidrofílicas, a umidade presente nos tecidos age como um ativador da reação química, sendo isto vantagem, pois não existiram inconvenientes quando utilizado em ambiente úmido, muito comum durante a realização de cirurgias paraendodônticas.

Torabinejad et al. (1994) realizaram investigações sobre a capacidade seladora do amálgama, super EBA, IRM e MTA, na presença ou ausência de sangue em cavidades apicais de 90 dentes humanos. Foi realizado o teste de infiltração marginal com azul de metileno a 1%. Decorridas 72 horas, os níveis de infiltração foram medidos e analisados, estatisticamente, através da análise de variância. A presença ou ausência de sangue não foi significativa, mas os resultados mostraram-se significantes para as diferenças de infiltração entre os materiais analisados ($p < 0,001$). O MTA infiltrou significativamente menos que outros materiais testados, com ou sem contaminação das cavidades apicais por sangue.

O MTA é apresentado na forma de pó cinza, constituído de finas partículas hidrofílicas, cujos componentes principais são o silicato tricálcio (CaO-SiO_3), silicato de cálcio (CaO-SiO_2), aluminato tricálcio ($3\text{CaO-Al}_2\text{O}_3$), ferroaluminato tetracálcio ($4\text{CaO-Al}_2\text{O}_3\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e sulfato de cálcio dihidratado ($\text{CaSO}_4\text{-2H}_2\text{O}$). Nessa composição pode ainda conter 0,6% de resíduos livres como a sílica cristalina e óxidos de cálcio e magnésios, além da presença do óxido de bismuto que tem a finalidade de conferir, ao material, algum grau de radiopacidade. As principais moléculas presentes são íons cálcio e fósforo. Esses íons também são os principais componentes dos tecidos dentais, e confere ao MTA excelente biocompatibilidade quando em contato com células e tecidos. As análises efetuadas demonstraram que o MTA, após tomar presa, passa a ser constituído por óxido de cálcio na forma de cristais discretos e o fosfato de cálcio, como uma estrutura amorfa, com aparência granular. A composição média dos prismas é de 87% de cálcio, 2,47% de sílica e o restante oxigênio. As áreas da estrutura amorfa contém 33% de cálcio, 49 % de

fosfato, 2% de carbono, 3% de cloreto e 6% de sílica. Possui pH inicial de 10,2 sendo que três horas após a mistura, o pH aumenta para 12,5 quando, então, permanece constante. Na opinião dos autores, pelo fato do MTA possuir um Ph semelhante ao hidróxido de cálcio, é possível que ele possa induzir a formação de tecido duro, quando utilizado como material retro-obturador. Por apresentar maior radiopacidade que a dentina, ele é facilmente identificado em radiografias, quando colocado nas retro-cavidades em cirurgias parendodônticas. Como resultado da hidratação do pó, forma-se um gel coloidal que se solidifica em menos de três horas, originando uma estrutura dura e resistente. As características desse agregado dependem do tamanho das partículas, da proporção pó/líquido utilizada, temperatura e presença de água. O tempo de presa e a força de compressão desse material foram determinados segundo os métodos recomendados pela *British Standards Institution* e o grau de solubilidade foi avaliado segundo as modificações e especificações da *American Dental Association*. O MTA apresentou o maior tempo de presa quando comparado ao amálgama de prata, sendo de 2 horas e 30 minutos e 4 minutos respectivamente. Com relação à resistência à compressão, nos períodos iniciais, o MTA apresentou os menores valores, mas com o passar do tempo ocorreu um aumento considerável (de 67 MPa's, após 21 dias de manipulação) comparável ao do IRM e Super-EBA. (Torabinejad et al. 1995b)

Torabinejad et al. (1995 b) realizaram novas investigações sobre a infiltração marginal utilizando metodologia de infiltração bacteriana. Nesta avaliação, foi determinado o tempo necessário para que *Staphylococcus epidermidis* penetrasse por 3 mm nas restaurações de amálgama, Super-EBA, IRM e MTA, em retro-obturações. Utilizaram, para este experimento, 56 dentes humanos extraídos, os quais foram preparados endodonticamente pela técnica *step-back*. Os ápices foram seccionados, sendo quarenta e oito obturados com os referidos materiais, quatro obturados com guta percha termoplastificada e cimento (controle positivo) e outros quatro selados com duas camadas de cera pegajosa (controle negativo). Após a adaptação dos grupos experimentais,

todos foram esterilizados em óxido de etileno por um período “overnight” e em seguida um décimo de micro litro de caldo bacteriano foi introduzido no interior de cada canal radicular. O número de dias gastos para que ocorresse a penetração bacteriana foi determinado. As penetrações nos grupos dentais do amálgama, Super-EBA e IRM variaram de 6 a 57 dias. Para o grupo de MTA não foi verificada infiltração bacteriana após 90 dias de observação. A análise estatística dos dados não apresentou significância para os três cimentos referidos anteriormente, entretanto a infiltração do MTA foi significativamente menor.

Utilizando os mesmos materiais, Torabinejad et al. (1995 c) investigaram a adaptação marginal das retro-obturações, através de microscopia eletrônica de varredura em 88 dentes humanos extraídos. As análises feitas através das fendas entre o material e a dentina mostraram que o MTA promoveu uma melhor adaptação quando comparado com o amálgama, SUPER- EBA, IRM.

Torabinejad et. al. (1995 d), após realizarem teste de infiltração e estudos em microscopia eletrônica, demonstraram que o MTA, usado nas retro-obturações permitiu menos infiltração e melhor adaptação marginal e buscaram testá-lo quanto ao aspecto da citotoxicidade. Compararam-no com os mesmos materiais, até então analisados (amálgama, Super-EBA, IRM). Utilizaram o método de ágar recoberto com crômio radioativo. As análises estatísticas dos dados desta técnica para o amálgama recentemente manipulado demonstraram que este foi menos citotóxico que os demais. O grupo do MTA ficou em segundo lugar. Testes estatísticos semelhantes revelaram diferenças significativas entre a citotoxicidade dos materiais recentemente manipulados quando comparados àqueles com 24 horas de incubação de células L929 de ratos marcados com crômio radioativo. O grau de citotoxicidade de MTA foi menor que para os outros materiais. Os resultados do presente trabalho suportam afirmação de que o MTA é um material em potencial para retro-obturações, necessitando de trabalhos *in vivo* para justificar sua utilização.

Em 1997, Torabinejad et al. realizaram estudos com o propósito de avaliar a resposta dos tecidos periradiculares em dentes de macacos ao MTA, comparado-o com o amálgama durante as obturações retrógradas. Removeram as polpas dos incisivos superiores de três macacos. Os canais foram preparados e obturados pela técnica de condensação lateral e restaurados com amálgama. Após cirurgia de acesso e ostectomia, os ápices dentais foram removidos, preparadas as cavidades apicais e obturadas com MTA e amálgama. A avaliação histológica foi realizada após cinco meses do início do experimento. As análises mostraram formação de cemento radicular em volta do ápice operado em cinco das seis amostras avaliadas para o MTA, enquanto que nos ápices obturados com o amálgama foi verificada a presença de processo inflamatório periradicular, não formando cemento em volta do ápice cortado. Baseados nestes resultados e em investigações prévias passaram a indicar o MTA para retro-obturações em humanos.

Torabinejad et al. (1998) realizaram experimentos com o propósito de examinar a reação tecidual ao implante de MTA, amálgama, material restaurador intermediário (IRM) e Super-EBA nas tíbias e mandíbulas de *Guinea pigs*. Após anestesiarem vinte *Guinea pigs*, rebateram o retalho e preparam cavidades ósseas. Os materiais testados foram colocados em copos de teflon e implantados em tíbias e dez dias depois em mandíbulas. Os animais foram sacrificados oitenta dias após e os tecidos foram preparados para exame histológico. A presença de inflamação, predominância de células típicas e tecido conjuntivo fibroso adjacente foram anotadas. A reação tecidual para o implante com MTA foi a mais favorável, uma vez que estavam livres de inflamação em todos os espécimes ($p < 0,01$). Na tíbia foi observada a aposição direta de osso nos experimentos realizados com o MTA. Baseados nesses resultados, os autores definiram o MTA como um material biocompatível.

Saidon et. al. (2003), evidenciando o uso do MTA para selamento ápico-radicular, no capeamento pulpar, no reparo das perfurações e em outros

procedimentos endodônticos, realizaram um estudo *in vitro* e *in vivo* em que compararam o efeito citotóxico por meio da avaliação da reação tecidual frente ao MTA e ao cimento Portland, utilizando experimentos em culturas celulares e implantes em mandíbula de cobaias (*Guinea pigs*). Para tanto, no estudo *in vitro* foram realizadas culturas celulares fibroblásticas (célula L929) em contato com amostra de ambos os materiais e, após o período de três dias de incubação, foram estudadas a quantidade e morfologia celular. No estudo *in vivo*, cobaias adultos machos foram anestesiadas e submetidas cirurgicamente à instalação de implantes de Teflon® preenchido com o MTA e cimento Portland na região de sínfise mandibular. Cada animal recebeu dois implantes (um com cimento Portland e um com MTA ProRoot®). Esses animais foram sacrificados após um período de 2 a 12 semanas e os tecidos processados e avaliados histologicamente. Pode-se constatar que ambos os materiais tanto no estudo *in vitro* quanto no estudo *in vivo* são bem tolerados, uma vez que não houve variação quantitativa ou morfológica da cultura celular e que houve reparação óssea e resposta inflamatória mínima.

Sousa et al. (2004) realizaram um experimento para avaliar as propriedades biológicas de três materiais dentários utilizados em cirurgia apical, o MTA (ProRoot MTA®; Dentsply Endodontics, Tulsa, OK, EUA), o ZOE (S.S. White, Rio de Janeiro, Brasil) e a resina composta Z100 (3M, St. Paul, MN, EUA). O estudo seguiu os critérios adotados pela FDI e ADA. Foram realizados implantes intra-ósseos em trinta *Guinea pigs*, sendo dez cobaias para cada material testado. Após a realização da cirurgia e esperados os tempos de observação de quatro e doze semanas, os animais foram sacrificados, tendo suas mandíbulas dissecadas e preparadas para análise histológica. A lateral do copo de Teflon® serviu como controle negativo. Após as análises qualitativas da intensidade de resposta inflamatória, foram classificadas em reação ausente ou suave, reação moderada e reação severa, segundo os critérios mencionados para classificar o material como biocompatível, possibilitando o contato com os tecidos vivos. Os resultados mostraram que todos os materiais testados, com exceção do ZOE,

apresentaram um nível de biocompatibilidade aceitável nos dois períodos experimentais, sendo o MTA, no entanto, o material que se destacou uma vez que se observou excelentes qualidades biológicas com crescimento ósseo em íntimo contato sem interposição de tecidos conectivos.

Rezende et al. (2005) por meio de cultura celular utilizando, macrófagos M1 e M2 de ratos, avaliaram o efeito do MTA na produção de citocinas. Nesse estudo, duas marcas comerciais de MTA, o MTA ProRoot® (Tulsa Dental Products, Tulsa, O.K. EUA) e o MTA Ângelus® (Laboratório Ângelus-Londrina, Brasil) foram testados através da avaliação da viabilidade celular e da produção de fatores tumorais como fator- α , interleucina (IL-12) e (IL-10). Para avaliar a viabilidade celular, 24 amostras contendo MTA foram incubadas por um período de 24, 48, 72 horas, processados e microscopicamente contados, sendo separados entre células vivas e células mortas. Não houve diferença significativa entre os dois materiais quanto ao número de células vivas, sendo a viabilidade celular estatisticamente superior a 97% em todas as culturas ($P < 0,005$) mostrando a biocompatibilidade do MTA.

Foi em 2005 que inicialmente, através de um estudo de Asgary, et. al., que começaram a se discutir especificamente os diferentes tipos de MTA com suas devidas particularidades. Os autores avaliaram as principais diferenças químicas existentes na composição do MTA branco e MTA cinza (ProRoot MTA®, Dentsply Tulsa Dental), sendo que as principais diferenças encontradas em ambos foram as maiores concentrações de óxido de alumínio (+122%), óxido de magnésio (+130%) e principalmente de óxido de ferro (+1000%) presentes na composição do MTA cinza. No entanto, os dois materiais possuem como seus principais componentes o óxido de cálcio, sílica e o óxido de bismuto.

No mesmo ano, Ribeiro et al. (2005), em um estudo *in vitro*, avaliaram a biocompatibilidade do MTA Branco® e o MTA Cinza® (Ângelus

Soluções Odontológica, Londrina, PR, Brasil). Os autores utilizaram o teste cometa e o teste de exclusão pelo azul de tripan para mesurarem o potencial de genotoxicidade e citotoxicidade destes em células de linfoma de ratos (L5178Y) subcultivadas três vezes antes de submeter-se ao experimento. No teste de citotoxicidade usando o método de exclusão, uma solução de 10 µl de azul de tripan (0,05%) em água destilada foi misturada em 10 µl de cultura celular e colocada em repouso por 5 minutos. Esse composto foi espalhado em uma lamínula e observado microscopicamente. As células não viáveis apareceram pigmentadas de azul. Pelo menos 200 células foram contadas por amostra. Esse teste avaliou a genotoxicidade química induzida pelo material, sendo que não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os dois tipos de MTA quanto à viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas. O teste cometa, também chamado de ensaio de célula única em gel, usado para avaliar a alteração estrutural do DNA celular, seguiu o protocolo recomendado por Tice et. al.(2000) que basicamente consiste em adicionar 10µl de células cultivadas (1×10^4 células) a 120µl de agarose de baixa fusão a 0,5% em temperatura de 37°C. Após a solidificação em geladeira, a lamínula é imersa em uma solução de Lise por aproximadamente uma hora. Antes de serem submetidas à eletroforese, as amostras são deixadas em solução tampão por vinte minutos. Após a eletroforese, também por vinte minutos, as lâminas são fixadas em álcool absoluto e armazenadas em temperatura ambiente até a análise. A fim de minimizar os danos no DNA das células pela radiação ultravioleta, todas as etapas são realizadas sob iluminação reduzida. No estudo foram capturadas aleatoriamente cinquenta células cometas em cada lamínula e analisadas em um microscópio de fluorescência em ampliação de 400X (Olympus, Orangeburg, EUA). Células não danificadas têm seu núcleo intacto e células danificadas apresentam o núcleo em forma de cauda semelhante a um cometa. A quantificação do dano estrutural do DNA é diretamente proporcional ao cálculo do comprimento de cauda da célula, sendo que ambos os materiais não induziram alteração do DNA celular em nenhuma das concentrações testadas. O resultado encontrado pelos autores reafirma o caráter de biocompatibilidade do MTA em ambas as

formas (branco e cinza) uma vez que não houve indícios de fatores relacionados à genotoxicidade e muito menos de fatores que interferisse na apoptose celular.

Huang et al. (2005) propuseram avaliar os efeitos dos materiais de vedamento radicular quanto à viabilidade de células ósseas, à expressão de citocinas inflamatórias e o seu papel em manter a saúde e estabilidade do tecido dental. O estudo utilizou cultura de células derivadas de osteosarcoma humano, linhagem U20S (*Nutrition Center*, Shin Zu, Taiwan) que foram colocadas em contato com três diferentes tipos de materiais usados como selantes apicais: cimento de hidróxido cálcio (Life[®], Kerr CO. Romulus, MI), cimento a base de eugenol (Super-EBA[®]; Bosworth Co. Durhan, UK) e MTA (ProRoot[®], Tulsa Dental, Tulsa, O.K.). Todos os materiais foram colocados em meio de cultura de aproximadamente 2 mm de espessura, por um período de uma semana a 37°C e 100% umidade. 1×10^4 células/ml foram incubadas em meio Coy suplementado com 10% soro fetal bovino, durante um período de três dias. Foram examinadas e fotografadas em microscópio de contraste, avaliando a expressão das citocinas IL-2, IL-4 e IL-10. Na análise morfológica, as células aderiram ao MTA, aumentando em número e densidade gradualmente, enquanto que nos outros dois materiais testados não houve adesão celular, ocorrendo um decréscimo quase a zero no número e na densidade celular. O MTA em contato com as células expressou uma quantidade maior de citocinas IL-2, IL-4, IL-10 em comparação aos outros materiais testados. Sendo a adesão celular considerada um critério específico para aceitabilidade de um material e a expressão de citocinas citadas responsáveis por fenômenos como resposta imune no processo de reparo, podemos concordar com os autores deste estudo ao se referirem ao MTA como sendo o material para selamento apical menos tóxico para as células do ligamento periodontal.

Em uma revisão de literatura, Pitt Ford & Camilleri (2006) analisaram composição e as propriedades biológicas do MTA, utilizando 206 trabalhos

publicados nas bases do medline entre o período da primeira publicação em novembro 1993 até publicações de agosto 2005. Neste período apresentavam-se disponíveis para o mercado duas formas comerciais de MTA: o ProRoot MTA® (*Tulsa Dental Products*, Tulsa, O.K. EUA) e o MTA Ângelus® (Laboratório Ângelus, Londrina - Brasil). Quanto à sua composição, o MTA apresentou elementos similares quando comparado ao cimento Portland, exceto pela presença de óxido de bismuto no MTA. Além disso, o MTA e o cimento Portland apresentam propriedades físico-químicas e biológicas semelhantes. A biocompatibilidade do MTA tem sido investigada de várias formas, como a análise de cultura celular, implantação subcutânea e intra-óssea e através de estudos *in vivo* por meio de contato direto com o tecido dentário. Quando se trata da investigação citológica de biocompatibilidade, a maioria dos estudos mostraram bom crescimento celular ao contato com o MTA com a formação de uma camada monocelular sobre o material. Os estudos mostraram que as reações de implantação do MTA intra-ósseo são menos intensas quando comparadas às reações de implantação subcutânea, sendo que ocorre osteogênese por meio de reparo ósseo e mínima reação inflamatória. Avaliando a reação tecidual periradicular frente ao MTA, observou-se uma precoce remodelação tecidual por meio da formação de um tecido conjuntivo organizado e posterior aposição de cimento sobre a camada de MTA. Quando analisado a reação do tecido pulpar frente ao uso do MTA, os estudos mostraram a formação de dentina reparadora. Coletivamente, estes estudos têm mostrado que o MTA é biocompatível, no entanto existe um leque de questionamentos sobre a sua interação com os tecidos circunvizinhos que deve ser investigada.

Coneglian et al. (2007) avaliaram, em um estudo *in vitro*, o potencial de selamento do MTA-Angelus® branco e cinza (Ângelus Soluções em Odontologia, Londrina, PR, Brasil) e do Cimento Portland branco (Cimentos Votorantim, Votorantim, São Paulo, SP, Brasil). No estudo foram utilizados 90 dentes humanos extraídos, obtidos do Departamento de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru, sendo todos uniradiculares com raízes

íntegras e com ápices radiculares completamente formados. Os dentes foram divididos em três grupos de acordo com o material testado: Grupo A = *plug* apical de MTA-Angelus cinza[®], Grupo B = *plug* apical de MTA-Angelus[®] branco e Grupo C = cimento Portland branco. Posteriormente, estes foram subdivididos em grupos de 10 dentes de acordo com as espessuras dos *plugs* apicais de 2, 5 e 7 mm. As coroas foram seccionadas na porção amelocementária para obter um melhor acesso ao canal radicular. Antes da confecção dos *plugs*, as raízes foram permeabilizadas com aplicação de um adesivo epoxy (Araldite[®] - Ciba-Geigy S.A., Taboão da Serra, SP, Brasil). Para a formação do *plug* apical, os materiais testados foram aplicados com uma lima lentulo 4 (Instrumentos Dentsply-Maillefer S.A., Ballaigues, Suíça) até a porção mais apical da raiz de forma mais condensada possível. Essa condensação foi realizada utilizando lima K-file[®] 40 com um stop posicionado a 2, 5, 7 mm aquém do comprimento radicular. O material foi colocado em repouso para tomar presa por aproximadamente três horas e a entrada do canal selada com adesivo epoxy. As raízes foram imersas em solução de Rodamina a 0,2% (Labsyth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil) em Ph 7,0 por 72 horas a 37°C. Então, foram lavadas em água corrente por 24 horas para remoção do adesivo e seccionado longitudinalmente na direção vestibulo-lingual, para exposição do *plug* apical. Foram fotografadas (Canon EOS Rebel 300 D[®]) e analisadas por um software de imagens (Centro de Ciências da Saúde da Univ. do Texas, San Antonio, Tx, EUA), sendo os dados tabulados estatisticamente pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn's (p=0,05). Os resultados apontaram diferenças significantes entre os grupos A (MTA cinza) e B (MTA branco) nos *plugs* de 2 mm com resultados melhores no grupo A. Nos *plugs* de 5mm não houve diferenças estatisticamente significantes na capacidade de selamento, mas nos *plugs* de 7 mm, o grupo B apresentou piores resultados que os outros grupos. O MTA branco apresentou resultados piores que o MTA cinza para todas as espessuras de *plug*, levando os autores a afirmarem que o MTA cinza e o cimento Portland têm uma habilidade de selamento melhor que o MTA branco, quando usado em *plugs* apicais.

Yoshimine et al. (2007) examinaram morfologicamente, em condições *in vitro*, a biocompatibilidade de três materiais de diferentes composições usados para selamento apical, dando ênfase na adesão celular osteoblástica, proliferação e formação de matriz. Os materiais testados foram o Mineral Trióxido Agregado (ProRoot MTA[®], Dentsply, Tulsa, Tulsa O.K, EUA) resina 4-META/ MMA-TBB[®] (Super-bond C&B; Sun Medical, Tokyo, Japão) e cimento Óxido de Zinco Eugenol reforçado (IRM Gaulk, Dentsply, Milford, DE). Cada material foi manipulado de acordo com o fabricante em meio estéril, utilizando instrumentais descartáveis e em seguida introduzidos em discos de Teflon[®] de 6 mm de diâmetro por 0,5 mm de espessura. Três amostras de cada material foram preparadas e armazenadas por dois dias em ambiente úmido a 37°C. Foram utilizadas células pré-osteoblásticas clonadas (MC3T3-E1) por apresentarem similaridades morfológicas e biomecânicas aos osteoblastos e cementoblastos. As células foram mantidas em meio α -mínimo essencial suplementado com soro fetal bovino 10%, 100 μ /ml de penicilina, 100 mg/ml estreptomicina e 50 g/ml de ácido ascórbico a 37°C em meio umidificado a 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. A face da tampa de cobertura dos discos foi usada como controle. A adesão celular e a proliferação, avaliada pela microscopia de fluorescência (Axioplan, Zeiss, Alemanha), foram quantificadas pelo número de células aderidas ao disco no período de incubação de seis horas e de três dias. Cinco amostras selecionadas randomizadamente foram analisadas estatisticamente pelo teste de *t Student* ($p < 0,05$). No vigésimo primeiro dia de cultura celular em contato com os materiais testados, as amostras foram processadas, descalcificadas e fixadas por quatro horas e sequentemente observadas em microscópio eletrônico de transmissão (H7000, Hitachi, Tokyo, Japão). Os dados do terceiro dia mostram as amostras contendo MTA e super Bond[®] apresentando um aumento celular significativo contrastando com aquelas contendo IRM. Já no vigésimo primeiro dia, ocorreu a formação de uma espessa camada de matriz sobre a superfície do MTA e do Super Bond[®] e nenhuma formação de matriz mineralizada na superfície do IRM. Apesar da necessidade de novos estudos estabelecendo os efeitos do MTA na diferenciação de células mineralizadoras como osteoblastos e

cementoblastos, os autores apontam um notório potencial formador de tecido mineralizado desse material, sugerindo a possibilidade clínica de regeneração do tecido calcificado como o cimento.

Em 2008, uma metanálise de Sanchez et al. avaliou o índice de sucesso e insucesso no vedamento apical e a biocompatibilidade do amálgama, IRM, Super-EBA e MTA como materiais retro-obturadores. Os autores, ao analisarem trinta artigos de publicações recentes, obtiveram um percentual de sucesso de 76,5% para o amálgama ligeiramente inferior ao encontrado pelo IRM. A performance do Super-EBA e MTA foram melhores, sendo que este último foi considerado o material mais biocompatível com praticamente nenhuma resposta inflamatória, uma vez que a regeneração tecidual e deposição de cimento foram observadas apenas nesse material. Diante dos achados literários os autores concluem que o MTA apresenta-se como o material ideal para o vedamento apical sendo, entretanto, necessária a confirmação desses achados por meio de estudos *in vivo*.

Em 2008, Saunders, em um estudo prospectivo utilizando recursos micro cirúrgicos, analisou a performance do MTA (MTA branco ProRoot; Dentsply, Johnson City, TN, EUA) levando em conta seu potencial retro-obturador em cirurgia periapical. Nessa avaliação foram utilizados 321 dentes, submetidos à cirurgia sob anestesia local, seguindo um protocolo clínico padronizado. Após o procedimento cirúrgico, os pacientes foram reavaliados periodicamente e examinados quanto aos sinais e sintomas inflamatórios pertinentes. No total de 276 dentes examinados, uma vez que 39 dentes foram perdidos durante o período de reavaliação, 163 dentes mostraram radiograficamente vedamento periapical completo sem nenhum outro sinal ou sintoma, 82 dentes não tiveram sintomas, mas apresentaram selamento apical incompleto ou incerto e 31 dentes não apresentaram selamento apical. Levando em consideração o alto índice de sucesso (88%) encontrado nesse estudo, os autores consideram o MTA como um material indicado ao vedamento apical associado a técnicas microcirúrgicas.

Em uma revisão literária, Bodrumlu (2008) cita uma série de trabalhos em que usaram os mais variados métodos para testar a biocompatibilidade dos materiais retro-obturadores. Dentre esses, foram citados tanto os testes de citotoxicidade tecidual e em cultura celular quanto trabalhos onde utilizaram implantes de teflon contendo materiais retro-obturadores em tecidos ósseo, conjuntivo e subcutâneo de animais experimentais. O autor revela que esses estudos apontam o MTA como sendo o menos tóxico em relação aos outros materiais testados, cita o estudo de Pelliogiioni et al.(2004), em que células osteoblásticas humanas se mostraram viáveis e favoráveis à proliferação mesmo após 72 horas em contato com MTA e concluindo que o material não destrói a população celular vizinha e que células osteoblásticas estariam preparadas para começarem a deposição óssea próxima ao material retro-obturador.

Stefopoulos et al. (2008), em um estudo comparativo, avaliaram a eficiência do MTA branco e cinza (ProRoot MTA[®], Dentsply, Tulsa, OK, EUA) no selamento do canal radicular, quando usado como barreira apical de dentes com ápices incompletos. Além disso, este estudo avaliou se a medicação intracanal prévia com hidróxido de cálcio afeta esta capacidade seladora. Quarenta e nove dentes uniradiculares recém extraídos foram radiografados e analisados em microscópio (10X) quanto à possibilidade de fratura radicular. Após preparo das cavidades para acesso do canal radicular, as raízes foram seccionadas a 2 mm do ápice e retro-instrumentadas usando um aparelho rotatório (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça) promovendo assim, um ápice convergente. Quatro dentes foram usados preliminarmente para avaliar a eficiência de remoção do hidróxido de cálcio das paredes do canal. Os dentes restantes foram randomizadamente divididos em quatro grupos (A – D) de dez dentes. Quatro dentes, um para cada grupo, serviram como controle negativo e um dente serviu como controle positivo. Os grupos A e B foram tratados com a medicação intracanal de hidróxido de cálcio enquanto os grupos D e C não receberam medicação prévia. Os grupos A e C receberam MTA cinza como barreira apical e os grupos B e D receberam MTA branco. Cada dente do

controle negativo foi tratado de acordo com seu grupo correspondente enquanto o dente do controle positivo foi deixado completamente vazio. Após a condensação do MTA em uma espessura de 4 mm, foram aguardadas 48 horas para presa final deste. Posteriormente os canais foram obturados com gutta-percha termicamente plastificada (Obtura II[®]; Obtura Iportan, Fenton, MO, EUA) e Cimento Endodôntico RothRoot 601[®] (Roth International LTA, Chicago, ILL, EUA), sendo os selamentos das cavidades feitos com IRM (Dentsply Detrey, Kanstanz, Alemanha). Acondicionados em um ambiente com 100% de umidade relativa a 37°C por duas semanas, os dentes foram retirados e seccionadas as coroas de forma que as raízes apresentassem o mesmo comprimento. Duas camadas de verniz foram aplicadas em toda a raiz, exceto 2 mm da porção apical, sendo que o controle negativo foi envernizado completamente, contrariamente ao controle positivo que não foi envernizado. Em seguida, todos os dentes foram imersos em solução de fucsina a 1% por 48 horas, lavados e seccionados longitudinalmente. Os resultados foram obtidos pela avaliação em microscópica (100X) e a máxima penetração do corante foi calculada por um software apropriado (Adobe Photoshop 7.0[®], Adobe Systems Inc., San José, C.A., EUA) em pelo menos cinco amostras de cada grupo. O estudo revelou que apenas quatro amostras tiveram a penetração da fucsina pela barreira apical, confirmando a habilidade de selamento do MTA. Comparando o MTA branco com o cinza, não houve diferença estatisticamente significativa em relação a este potencial. A única diferença significativa observada foi entre o grupo do MTA branco que obteve melhor selamento apical quando usado sem prévia medicação intracanal com Hidróxido de Cálcio, o que leva a entender que esta medicação é uma barreira química e física na adaptação do desse tipo de MTA nas paredes do canal radicular. Essa diferença de comportamento dos dois MTAs frente ao hidróxido de cálcio pode ser explicada pela ausência do Fe₂O₃ no MTA branco. Os autores, levando em consideração a excelente biocompatibilidade do MTA, entendem que o seu uso como barreira apical seja uma alternativa realista no procedimento de apexificação com hidróxido de cálcio.

Storm et al. (2008), em um estudo comparativo, avaliaram a diferença das configurações dimensionais e alterações de expansão entre o MTA cinza e o MTA branco. Para o ensaio, foi fabricado um dispositivo que consiste em um dilatômetro em um pistão de nylon ligado em um transformador variável de deslocamento, capaz de mensurar com mais exatidão a expansão linear. Ambos os MTAs e o cimento Portland, que foi usado com grupo controle, foram manipulados de acordo com as recomendações do fabricante, sendo este último manipulado na proporção de 3:1 (pó/líquido). Os materiais foram colocados em um molde cilíndrico de polivinil de 10 mm de altura por 5 mm de diâmetro e cobertos com água destilada ou com solução salina de Hank (HBSS), sendo então armazenados em temperatura ambiente para tomar presa. Para medir a variação da expansão linear, um pistão de nylon acoplado ao transformador variável de deslocamento foi posicionado sobre a superfície de cada amostra. Cada tipo de material teve de três a cinco amostras testadas por um período de 24 horas e analisadas estatisticamente pelo teste *t Student* e pela análise de variância ($p = 0,05$). A expansão das amostras foi monitorada em função do tempo, sendo que em ambos MTAs alcançaram cerca de 75% de sua expansão em 460 minutos (7 horas e 40 minutos) e o cimento Portland, mostrou uma expansão mais rápida, com cerca de 80% de expansão em 300 minutos (5 horas). As amostras, tanto cobertas por água destilada quanto por HBSS, mostraram coeficientes de expansão com diferenças estatisticamente significantes. O MTA cinza teve uma expansão maior ($1,02\% \pm 0,19\%$) que o MTA branco ($0,08\% \pm 0,01\%$) sendo a expansão do cimento Portland de $0,29\% \pm 0,04\%$. O artigo ressalta que o sucesso de um tratamento endodôntico, seja ele cirúrgico ou não, depende de um selamento hermético do canal radicular para evitar infiltração bacteriana, sendo este selamento diretamente associado à estabilidade dimensional do material empregado. Assim, os autores, mesmo desconhecendo a significância dos achados em condições clínicas dos dados encontrados, apontam uma tendência ao emprego do MTA branco em decorrência de sua menor expansão (0,1%) em relação ao do MTA cinza (1%), fato esse que poderia afetar significativamente o selamento apical.

Em um estudo prospectivo randomizado, Christiansen et al. (2009) compararam o tratamento de lesões periapicais utilizando rizectomia com retro-obturação com MTA (ProRoot Dentsply®, Tulsa Dental, Jhonshon City, TN EUA) ou apenas rizectomia com obturação com guta percha. Para ambas as técnicas foi seguido o protocolo da RGT (Mother et al. 2001). Neste estudo foram tratados 68 pacientes e um total de 77 elementos dentários com lesões periapicais submetidas a critérios de inclusões. Os dentes deveriam ser incisivos, caninos ou pré-molares em que as raízes obturadas apresentassem lesões periapicais que tivessem sido acompanhadas por um período mínimo de dois anos e que fosse constatado o processo de progressão das mesmas. Ainda assim, a perda óssea marginal do dente não poderia ultrapassar 50% de sua inserção. Após um período de acompanhamento de 12 meses, o grupo que usou a guta-percha como material obturador obteve 28% de cicatrização apical completa, 24% de cicatrização incompleta onde apresentaram áreas de cicatrizes, 24% dos casos apresentaram cicatrização incerta e 8% cicatrização insatisfatória. Já no grupo que recebeu o MTA como material retro-obturador, 85% dos casos apresentaram cicatrização completa, 12% com cicatrização incompleta, apresentando tecidos cicatriciais e nenhum caso de cicatrização incerta ou insatisfatória ($P < 0,001$), concluindo que este material retro-obturador apresenta um índice maior de sucesso em tratamento de lesões periapicais quando comparado com a técnica de obturação utilizando guta-percha.

Os materiais obturadores e retro-obturadores certamente entram em contato com os tecidos bucais, podendo causar reações inflamatórias, ocasionando desconforto e dor associados à terapia endodôntica. Para tanto, torna-se crucial o uso de materiais sem ou com efeitos tóxicos/irritantes limitados. Foi no intuito de investigar os efeitos noceptivos e anti-noceptivos do MTA que Abbasipour, et al. (2009) realizaram um estudo experimental em ratos, aplicando os testes de formalina orofacial descrito por Chave em 1999. No trabalho foram utilizados 10 ratos para cada grupo, sendo que no primeiro grupo foi administrado 40µl de solução formalina a 2,5% e eugenol (50 mg/kg⁻¹)

e no segundo grupo 5, 10 e 20 ml de MTA branco (ProoRoot®, Dentsply Tulsa, Dental, Joshonson City, TN, EUA) dissolvido em 0,2 ml de solução salina. No segundo experimento, para avaliar os efeitos anti-nocivos, 15 minutos antes da injeção de formalina, os ratos foram pré-tratados com MTA branco (20 mg dissolvido em 0,2 ml solução salina) ou com eugenol. Os resultados mostraram que o MTA em qualquer dose administrada induz menor efeito noceptivo do que a injeção de formalina. Além do que, os animais que receberam o tratamento prévio com injeção de MTA apresentaram um efeito anti-noceptivo maior em comparação àqueles que tiveram o tratamento com eugenol. Assim, os autores concluíram que a aplicação clínica do MTA pode reduzir a dor pós-operatória na propedêutica endodôntica, uma vez que este material aparentemente não produz efeito irritante ao tecido, além de ser um agente paliativo mais eficiente que o eugenol contra a dor.

Embora haja relatos prévios da biocompatibilidade do MTA, ainda pouco se sabe sobre o seu papel na indução do processo inflamatório e reparador. Assim, Minamikawa et al. (2009) conduziu um estudo *in vivo* observando o efeito deste material na expressão do fator pró-inflamatório de transcrição nuclear Kappa B (NF- κ B), localizado no citosol celular de forma inativa. Esse fator, quando ativado, transloca para o núcleo celular e liga a determinadas seqüências de DNA, iniciando a transcrição do processo responsável pela regulação da expressão de genes relacionados ao curso inflamatório. Neste estudo, o MTA foi manipulado de acordo com recomendações do fabricante e colocado em moldes de plásticos de 4 mm de diâmetro por 2 mm de altura e armazenados em meio umidificado por 7 dias a 37°C. A partir desse substrato, obteve-se um meio condicionado de MTA. Este foi encubado em uma placa de 12 poços em um meio umidificado a 37°C, contendo 5 ml de DeMEM por uma semana. Na cultura celular foi utilizada uma linhagem RPC-C2A (células clonais da polpa dentária de rato) mantida em DeMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%. Estas foram cultivadas com extratos de MTA por 1, 3, 6, 12 ou 24 horas. Os resultados mostram que o MTA induz a ativação do NF- κ B que por sua vez induz a expressão do gene da

COX₂ e INO₂, responsáveis pelo aumento do nível de prostaglandina, a principal mediadora do processo inflamatório. Além de corroborar com outros estudos quanto ao potencial do MTA em estimular a expressão do gene responsável pela formação da Matriz mineralizada, este estudo também sugere que o MTA induz a expressão de prostaglandina (PGE₂), podendo ter um papel importante na formação de ponte dentinária.

Tabarsi, et al. (2010) em um estudo *in vivo*, utilizaram seis cães da raça Beagle para avaliarem a resposta celular da polpa dentária frente a três agentes de capeamento pulpar: Hidróxido de cálcio (HC), Mineral Trióxido Agregado (M.T.A.) e um novo cimento endodôntico enriquecido com cálcio (CEM). O processo investigativo envolveu 36 dentes de seis cães machos de idade entre doze a dezesseis meses. O segundo e terceiro pré-molares foram submetidos à pulpectomia coronal e em seguida pulpotomia cervical com HC (Dentsply Dentrey, Cmbh, Konstanz, Alemanha), MTA (ProRoot, Dentsply, Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA) ou CEM, concomitantemente as cavidades foram restauradas com amálgamas. Decorrido um período de 8 semanas realizou-se a eutanásia dos animais por overdose anestésica e obtiveram os cortes histológicos que foram analisados quanto à intensidade da inflamação pulpar e formação de ponte de calcificação dentinária; para isso foi usado uma base de cálculo preconizada por Aeinehchi et al. (2003) e Domingues et al. (2003). Os resultados das amostras do MTA e do CEM foram significativamente melhores que o HC com relação à formação de ponte dentinária, vitalidade pulpar e intensidade inflamatória. Sendo assim, os autores concluíram que o MTA e o CEM são materiais favoráveis quando no uso em pulpotomia cervical, sendo, porém necessários novos estudos elucidando as propriedades biológicas e o potencial expressão de citocinas desses materiais.

Parajade, et al. (2010) realizaram uma investigação para delinear os possíveis mecanismos de ação do MTA no processo de formação da barreira de dentina e para determinar os efeitos desse material sobre as células da

polpa dentária quando em contato direto. Utilizaram culturas de células adicionadas ao MTA cinza (ProRoot MTA, Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, O.K) incubados por 48 horas à 37°C em um meio umidificado (5% CO₂ e 95 % ar atmosférico). As culturas celulares foram realizadas em condições variadas e em diferentes tempos (1, 4 e 7 dias). As amostras foram processadas e examinadas em um microscópio eletrônico de varredura, sendo que o RNA foi isolado pela ação de reagente Trizol (Invitrogen / GIBCO BRI Carlsbad, CA). Os resultados indicaram que na presença do MTA, a porcentagem de células variáveis foi de 82%, similar ao resultado conseguido no grupo controle que foi de 80%. Além disso, os níveis de secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) praticamente dobraram quando as células cresceram na presença do MTA. A secreção do VEGF é um fator crucial no processo de reparo pulpar, o que associa o MTA ao aumento da proliferação e sobrevivência das células da polpa dentária. As células cultivadas em contato com o MTA, quando analisadas em períodos diferentes, mostraram um alto nível de expressão de proteínas específicas como sialoproteína de dentina, osteoproteína, osteocalcina, colágeno tipo I e fosfatase alcalina que são proteínas específicas expressadas pelos osteoblastos, que por sua vez, são células responsáveis pela secreção e mineralização da matriz extracelular de dentina. Ao examinar células pulpares em contato com MTA, estas apresentaram-se menos fibrosas e mais diferenciadas. Esses resultados suportam a afirmação de que o MTA promove proliferação celular, diminui inflamação pulpar e induz a diferenciação de células da polpa dentária e de células odontoblásticas, justificando, assim, a sua utilização clínica como agente efetivo do capeamento pulpar.

Baek et al.(2010) avaliaram o potencial de regeneração óssea frente ao uso de três diferentes materiais retro-obturadores. O estudo analisou a distância entre o material utilizado e o osso neoformado após a realização de micro-cirurgia parendodôntica em dentes de cinco cães fêmeas da raça Beagle. Cada animal foi submetido à técnica anestésica protocolar, em que a pré-anestesia deu-se pela injeção intramuscular de 0,7 mg/kg de acepromazina

(Aveco Co. Inc. , Ford Dodge, IA) e a sedação pela injeção intra-venosa de 0,7mg/kg de propofol, subsequentemente processada a administração via endocrondal de anestésico inalatório de isofluorane (2% a 3%). O tecido pulpar dos molares e pré-molares foi extirpado e a cavidade endodôntica contaminada por pontas de papel contendo placa bacteriana. Após quatro a seis semanas, verificou-se radiograficamente a formação de lesões periapicais. Então os dentes foram tratados endodônticamente e as aberturas coronárias restauradas com IRM (Dentsply, York, PA). Transcorrido o período de uma semana do tratamento endodôntico, realizou-se a micro-cirurgia em que, utilizando um microscópio de magnificação de 8 à 24X, rebateu-se um retalho mucoperiósteo triangular, com incisão relaxante na mesial, ostectomia do osso cortical e medular próximo à região apical do dente, utilizando instrumento de alta rotação sob irrigação com água, criando assim, uma cavidade óssea de aproximadamente 4x4 mm de diâmetro. Após rizectomia e curetagem da lesão periapical, uma cavidade de 3 mm de profundidade foi realizada pela retro-instrumentação com ultrassom Kis Tip® (Obtura/Sparton, Fenton, MO). As raízes ressectadas de 24 dentes foram randomizadamente divididas em três grupos: grupo A retro-obturadas com amálgama (Tytin; Kerr Mfg Co, Ramulus, MI), grupo B retro-obturados com Super –EBA (Bosworth , Skokie, IL) e grupo C retro-obturadas com MTA-cinza (Dentsply, York, PA). Decorridos quatro meses do último procedimento cirúrgico, os cães foram sacrificados por overdose de pentobarbital de sódio (Nembutal; Abbot Lab., North Chicago, IL), as mandíbulas ressectadas e preparadas histologicamente, conseguindo cortes de aproximadamente 80 µm de espessura. A distância entre o material retro-obturador e o osso neoformado foi calculada baseando em três pontos: a margem vestibular, o centro e a margem lingual do canal retro-obturado. Das 24 amostras, 1 foi excluída, uma vez que o amálgama utilizado na retro-obturação dissociou-se da cavidade no período cicatricial . O grupo do MTA mostrou uma regeneração óssea superior aos outros dois grupos, uma vez que a distância entre o material retro-obturador e osso neoformado foi menor ($0,397 \pm 0,278$ mm no grupo MTA, $0,756 \pm 0,581$ mm no grupo Super EBA e $1,290 \pm 0,386$ mm no grupo amálgama). Esses dados são comparáveis à distância

normal do ligamento periodontal em cachorros, que seria de $0,386 \pm 0,025$ mm (apud Lindhe, 1979), sugerindo que o mineral trióxido agregado tem habilidade de promover tanto a regeneração óssea quanto do ligamento periodontal.

O MTA vem sendo extremamente utilizado como um biomaterial estimulador da dentinogênese e cementogênese, no entanto, o mecanismo biológico que induz a deposição desses tecidos duros ainda permanece desconhecido. Para aprofundar o estudo desse processo foi que Reyes-Carmona et al. (2010) analisaram *in vivo* a interação do MTA ao tecido hospedeiro, avaliando moléculas sinalizadoras responsáveis pela resposta inflamatória e biomineralização. 80 tubos de dentina obtidos de dentes humanos extraídos, foram preparados e preenchidos com MTA ProRoot® (Dentsply, Tulsa Dental, OK, EUA) e outros mantidos vazios como grupo controle. Camundongos machos suíços foram anestesiados e submetidos à cirurgia de implantação de 3 tubos em região dorsal sendo 2 contendo MTA e um vazio. Após 12 horas, 1, 3, e 7 dias, os animais foram sacrificados e os tubos com o tecido circunvizinho removidos. A metade dos tubos foi fixada para análise histológica e imunohistoquímica da expressão de citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 responsáveis pelo efeito regulador da resposta inflamatória. A outra metade das amostras foi processada de maneira que fossem recuperados os tubos de dentina para a análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados mostram uma relação tempo-dependente do MTA na expressão e regularização das citocinas pró-inflamatória em um período de três dias, bem como o aumento na expressão ciclooxygenase-2, fator de crescimento vascular endotelial e iNOS, principais reguladores da angiogênese responsável pelo processo de reparo. A MEV revelou a presença de apatita sobre os tubos contendo MTA após 12 horas de implantação e que, com o aumento do tempo de implantação, uma maior área de mineralização foi observada a ponto de que no sétimo dia, uma compacta camada de apatita foi observada sobre a superfície dos tubos de dentina. Os autores afirmam a capacidade do MTA de promover um ambiente favorável ao processo pró-inflamatório e cicatricial, uma

vez que a biomineralização ocorreu simultaneamente e em perfeita interação entre o biomaterial, a dentina e o tecido hospedeiro.

Camilleri & Mallia (2011), baseados em estudos recentes como o de Weller et al. (2008) e o de Gomes-filho et al. (2009) que apresentaram resultados similares quanto à biocompatibilidade entre os cimentos à base de MTA e o MTA puro, avaliaram o tempo de presa, a absorvância, a microestrutura e a porosidade de um cimento endodôntico à base de MTA. Para o experimento utilizou-se Mineral trióxido agregado (MTA branco, Dentsply®, Tulsa Dental Products, Tulsa, O.K., EUA), água destilada, polímero solúvel em água (Degussa Construction Chemicals, Manchester, Reino Unido) e cimento endodôntico (PCS, Kerr-Howe S.A., Biaggio, Suíça) em várias proporções nomeadas de MTA (MTA + água destilada), MTAS (MTA + água destilada + polímero solúvel em água) e PCS (Óxido de zinco e eugenol). O tempo de presa dos cimentos foi determinado baseando nos padrões preconizados pela resolução ISO 6876 (2009), de forma que os cimentos foram manipulados e colocados em moldes de diâmetro interno de 10 mm por 2 mm de altura, sendo o tempo de presa aquele resultante do momento do término da manipulação do cimento até quando nenhuma marca fosse visível a olho nu no teste de indentação. A absorvância foi realizada em amostras de cimento medindo 10 mm de diâmetro por 1,5mm de altura, sendo que doze amostras foram preparadas para cada tipo de cimento. Dessas, seis foram armazenadas em HBSS (solução salina Hank balanceada) e as seis restantes em ar a 37°C e 100% umidade. O peso das amostras foi colhido em tempo pré-determinado de 3, 24, 72 e 188 horas e o grau de absorção calculado usando uma equação que subtraía o peso da amostra no tempo pré-determinado pelo peso da amostra após o tempo de presa, dividindo o resultado pelo peso original. Na caracterização da microestrutura em fluido corporal simulado, amostras retangulares (8 mm x 10 mm x 5 mm) foram preparadas e armazenadas por 24 horas a 37°C em 100% umidade atmosféricas. Essas amostras, após serem desmoldadas e armazenadas em HBSS por sete dias, foram seccionadas ao meio por um micrótomo (Struers, Willich, Alemanha) e analisadas em um

microscópio estéreo (Remet SMZ-2T, Bologna, Itália) e em um microscópio óptico (Nikon Optihot 100, Tóquio, Japão) em maior aumento. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo software SPSS Package (SPSS Inc., Chicago, ILL, EUA) usando o teste de Tukey e análise de variância (ANOVA). O MTA, quando adicionado ao polímero à base de água, apresentou um tempo de presa menor ($P < 0,05$), considerado adequado pelos autores, além do que o MTAS (cimento à base de MTA) apresentou uma estabilidade dimensional dentro dos limites sugeridos pela ISO 6876, mantendo sua microestrutura com menor porosidade em comparação ao MTA, levando a crer que o material tem potencial de ser usado como cimento endodôntico na prática clínica.

Gandolfi et al. (2011), já sabendo da boa atividade biológica do fluoreto de sódio frente aos osteoblastos e células da polpa dentária, avaliaram a resposta da incorporação desse produto ao cimento de silicato de cálcio (MTA) experimental. Esse novo nanomaterial, desenvolvido com o potencial de se tornar um produto com bioatividade favorável ao uso em endodontia e cirurgia oral, foi investigado tendo por base a cinética de formação da apatita e liberação de íons. A pesquisa deu-se em uma solução que simula o fluido extracelular, sendo analisada em microscopia eletrônica de varredura acoplada à radiografia de energia dispersa (ESEM-EDS) e análise infravermelha com micro-Roman (FTIR). Os cimentos termicamente tratados de silicato de cálcio em nanopartículas, compostos de silicato di- e tricálcio, alumínio tricálcio, sulfato tricálcio, cloreto de cálcio e óxido de bismuto foram preparados. Uma adição de fluoreto de sódio a 1% ou a 10% do peso total foram adicionados aos cimentos de silicato de cálcio, resultando na produção de dois cimentos experimentais, identificados como FTC e F10TC respectivamente (Gandolfi laboratorial de Biomateriais, Bologna, Itália). Estes foram misturados a uma solução tampão Dulbecco (cat. N. BE 17-512; Lanza, Verniers, Bélgica) na proporção pó/líquido de 0,3 produzindo uma pasta homogênea. Após a preparação, as pastas de cimento foram colocadas em moldes de PVC (8 mm de diâmetro por 1,6 mm de espessura) para padronização das amostras. No

teste *in vitro*, em que avaliou a habilidade de formação de apatita, cada disco de cimento foi colocado em um recipiente cilíndrico de polietileno (3 cm de altura e 4 cm de diâmetro) hermeticamente fechado, contendo 5 ml de solução salina tamponada, mantida a 37°C até um tempo final pré-determinado de 1, 7 e 28 dias. Imediatamente após a sua preparação, após 1 dia (Grupo 1 dia-idade) e após 28 dias (Grupo 28 dia-idade), os cimentos foram submetidos a análises de ESEM–EDS e espectroscopia. Para analisar o pH e o conteúdo de cálcio e flúor das amostras, cada disco foi colocado em um cilindro de polietileno hermeticamente fechado contendo 10ml de água e mantido por um período de tempo pré-determinado de 5 horas, 24 horas 3, 7, 14 e 28 dias. O pH foi medido por um eletrodo de compensação de temperatura seletivo (Sen Tix Sur WTW, Weilheim, Alemanha) conectado a um medidor de multiparâmetros de laboratório (Inolab 750; WTW). Para quantificação de cálcio, 0,100 ml do ISA (4 mol L⁻¹ KCL; WTW) foi adicionado a 5 ml do meio condicionado e o teor avaliado por uma sonda (eletrodo de íon cálcio; instrumentos Eutech Ltd; Singapura) conectado a um medidor de multiparâmetro de laboratório (inolab 750; WTW). Para a avaliação de flúor, 5 ml de TISAB (5,8% de cloreto de sódio, 5,7% de ácido acético, 3,0% de hidróxido de sódio, 0,4% CDTA e água) foram adicionados a 5 ml de meio condicionado e o conteúdo também foi avaliado usando uma sonda (eletrodo de íon flúor, Instrumentos Eutech Ltd; Singapura) conectado a um medidor de multiparâmetros de laboratório (inolab 750; WTW). Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente usando o teste de Tukey em conjunto com a análise de variância *two-way Anova*, sendo que foi observado que a adição de flúor ao cimento de silicato foi capaz de aumentar fortemente o pH do meio, principalmente para os tempos de armazenamento de curta duração, resultando em uma maior hidratação do cimento. Além do que, a análise de espectroscopia mostrou que o cimento de silicato incorporado de fluoreto de sódio (FTC e F10TC) apresentou maior potencial de formação de apatita do que o cimento de silicato puro. Os autores afirmam que o cimento experimental produzido é mais capaz de formar apatita (maior bioatividade) e são mais reativas que os cimentos de silicato convencionais, sendo então, considerados

materiais promissores para o uso em contato com osso na prática da endodontia e da cirurgia oral.

Gomes-filho, et al. (2011), em um estudo *in vivo*, por meio da análise histológica e de fluorescência, avaliaram a resposta do osso alveolar de ratos ao contato com MTA Ângelus® (Ângelus Soluções Odontológicas. Londrina, PR, Brasil) ou ao contato com MTA fotopolimerizável (Bisco, IL, EUA). O estudo utilizou trinta ratos Wistar Albino, divididos em três grupos. Estes foram anestesiados com 87 mg/Kg de Quetamina (Francotar, Virbas do Brasil Ind. e Com. Ltda, Roseira, Brasil) e 13 mg/kg de Xilazina (Ropum, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil) e submetidos à extração do incisivo direito. Após hemostasia, cada animal recebeu um implante de Teflon (Laboratórios Abbott do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) de 3 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro interno. No total foram instalados 10 implantes para cada material testado, sendo que 10 foram implantados vazios como grupo controle. Os materiais foram manipulados de acordo com o fabricante, sendo o MTA experimental fotopolimerizado por 60 segundos, usando uma unidade fotopolimerizadora (Ultralux Dabi-Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Marcadores ósseos fluorescentes: Calceína verde, Vermelho de Alizarina e Cloridrato de oxitetraciclina foram injetados em cada animal após 7, 14 e 21 dias de implantação. Sacrificados os animais após trinta dias, suas maxilas foram fixadas em formalina a 10%. Das amostras, quinze foram desmineralizadas em EDTA a 18% e processadas histologicamente, sendo a reação do tecido em contato direto com o material da extremidade do implante analisada estatisticamente pelos testes Kruskal-Wallis e análise de variância ($p < 0,05$). As amostras remanescentes foram embebidas em historesina (Companhia de Resina Londres, Berkshire, Inglaterra), sendo, obtidos cortes de 200 μ m que foram examinados em microscopia de fluorescência. Os resultados, submetidos a análises estatísticas de variância e Newman-Keuls ($p < 0,05$), mostraram uma reação inflamatória moderada após 30 dias em ambos os materiais testados, sendo que nos implantes preenchidos com MTA Ângelus® observou-se histologicamente uma cápsula fibrosa fina ao seu entorno e um

tecido ósseo em próximo contato com áreas de calcificação distrófica (mineralização considerada quando nenhum outro tecido é observado entre o tecido mineralizado e o osso alveolar). Já o MTA polimerizável, apesar de similarmente ter um tecido ósseo em próximo contato, não apresentou nenhuma área de calcificação distrófica. Os autores concluíram que o MTA Ângelus® e o MTA fotopolimerizável® apresentam uma resposta inflamatória e uma cicatrização óssea similar, no entanto apenas o primeiro estimulou a mineralização distrófica, fato este justificado pela presença do Bisfenol-alpha metacrilato, principal composto do MTA fotopolimerizável.

Na premissa de que todo material experimental que entre em contato com os tecidos deve ser examinado, Parirokh, et al. (2011) propuseram um estudo que comparasse a biocompatibilidade do MTA cinza e branco e o cimento de cálcio enriquecido (CEM). Sendo o protocolo da pesquisa aprovado pelo comitê de ética da Universidade de Ciências Médicas de Kerman (protocolo nº KA185175), o estudo foi conduzido utilizando 36 ratos machos da raça Wistar Albino, pesando entre 200 – 250 mg. Os animais foram anestesiados pela injeção intraperitoneal de 47,5 mg/kg⁻¹ de Quetamina (Alfason, Woerden, Holanda); como anestésico para o alívio da dor foi administrado 0,1ml de lidocaína a 2% com epinefrina 1:80.000 (Daruparkhsh, Teran, Iran). Cada animal recebeu três implantes de Teflon (7 mm de comprimento e 1,7 mm de diâmetro interno) contendo ora MTA cinza ProRoot®, ora MTA branco ProRoot® (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa OK, USA), ora CEM® (Ycktazdandan, Bionique Dent.). Todos os materiais foram preparados seguindo as recomendações do fabricante na proporção pó/líquido de 3:1. Os animais foram randomizadamente divididos em três grupos contendo doze animais em cada grupo. Sacrificados os animais após sete, trinta e sessenta dias de implantação, obtiveram blocos contendo implante, tecido conectivo e pele que foram mantidos em formalina a 10% por 48 horas. Cortes histológicos, a partir da fixação das amostras, foram produzidos no sentido do longo eixo dos tubos de teflon. Estes, em seguida submeteram-se à avaliação histológica por um único patologista, desconhecedor do tipo de

material testado e do intervalo de avaliação dos mesmos. A reação tecidual de ambas as extremidades do tubo foram avaliadas e mensuradas pelos critérios histológicos, levando em consideração a espessura da cápsula de tecido conectivo definido pela sua extensão ao redor do tubo de teflon; também avaliaram a severidade e a extensão da inflamação definida como sendo a concentração de células inflamatórias dentro e ao redor da cápsula de tecido conectivo; a presença ou não de tecido necrótico e o tipo de células inflamatórias observadas. Usando testes não para métricos de Kruskal Wallis e Chi-quadrado ($p=0,02$), os resultados mostraram inflamação crônica em ambas as extremidades do tubo em todos os materiais testados, além do que achados de calcificações precipitadas foram observadas em 33% das amostras de MTA cinza e em 22% das amostras do MTA branco ProRoot® e CEM®. No intervalo de trinta dias, o MTA cinza ProRoot® apresentou a menor extensão de inflamação em comparação aos outros materiais testados. No intervalo de sessenta dias, não foi observada diferença estatística entre as espécimes quanto à espessura da cápsula e à severidade inflamatória. Sendo assim, autores afirmam que ambos MTA e CEM são bem tolerados e que a presença de processo de calcificação, em resposta aos materiais testados, revela a habilidade osteoindutora dos mesmos quando em contato com tecidos conectivos

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo da presente investigação é o de comparar, através de um modelo experimental, com parâmetros definidos pelo FDI (Federation Dentaire Internationale), a resposta inflamatória no tecido ósseo frente aos quatro tipos de MTA (Mineral Trioxide Aggregate) disponíveis no mercado, sugeridos como obturadores endodônticos apicais, durante as cirurgias pararendodônticas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais testados

1. MTA-Ângelus Cinza®. (Ângelus Soluções Odontológica, Londrina, PR, Brasil)
2. MTA-Ângelus Branco®. (Ângelus Soluções Odontológica, Londrina, PR, Brasil)
3. MTA ProRoot Cinza®. (ProRoot Dentsply , Tulsa Dental, Tulsa, O.K.)
4. MTA ProRoot Branco®. (ProRoot Dentsply, Tulsa Dental, Tulsa, O.K.)

4.2 Implantes Intra ósseo

Esta modalidade de teste é realizada para se avaliar a toxicidade *in vivo* dos materiais utilizados em Odontologia e que estão em contato direto com o osso.

Para este experimento foram utilizadas cobaias (*Guinea-pig*) com aproximadamente 800 gramas de peso, mantidos em gaiolas durante o experimento, em ambiente de temperatura controlada (22 °C), com controle de luz em ciclos de claro-escuro de 12 horas, recebendo ração e água *ad libitum*. Este Trabalho previamente aprovado pelo CEUA (Comitê de Ética na Utilização de Animais) da Universidade Federal de Uberlândia - Nº 070/11.

Utilizaram-se 10 animais para cada material, divididos em períodos experimentais de 04 e 12 semanas (cinco cobaias para cada período), totalizando 40 cobaias. Assim, puderam ser avaliados 20 implantes para cada material, sendo 10 para cada tempo experimental.

Os animais foram submetidos à anestesia geral através de injeção intramuscular de 0,6ml de solução anestésica contendo cloridrato de quetamina 100 mg/ml (Francotar[®] - Brasil) e cloridrato de xilazina a 2% 0,5mg/ml (Dorcipec[®] - Brasil) na proporção de 2:1 respectivamente. Após a anestesia, realizaram-se procedimentos necessários à manutenção da cadeia asséptica, tricotomia da região mentoniana e assepsia da área com iodopolividona a 10% (Riodeine[®] - Brasil), além de injeção local intra-oral de aproximadamente 0,3 ml de cloridrato de lidocaína a 2% com epinefrina 1:100.000 (Lidocaína 100[®] - Brasil) na mucosa sinfisária, próxima à área dos implantes, buscando evitar desconforto e movimentação do animal.

Após a incisão, deflexão do retalho cirúrgico e exposição do tecido ósseo, foram feitos preparos cavitários em ambos os lados da sínfise mandibular, com 2 mm de diâmetro e de profundidade, para receber copos de teflon, com o material manipulado conforme técnica preconizada.(figura 1)

Para este procedimento utilizou-se micro-motor cirúrgico a uma rotação de 2.000 a 3.000 rpm com brocas especiais padronizadas, sob irrigação constante com soro fisiológico esterilizado.

Este dispositivo cilíndrico de Teflon[®] é aberto em uma de suas extremidades, sendo que a sua superfície externa contém sulcos para a sua melhor fixação no tecido ósseo. Este cilindro possui 2 mm de comprimento com 1,3 mm de diâmetro interno e 2 mm de diâmetro externo. Sua limpeza e descontaminação foram realizadas através da imersão em clorofórmio a 10%, para remoção de graxa impregnada quando da sua usinagem, seguido por banho em álcool 70%, dois banhos em água destilada e, finalmente, autoclavados antes de serem utilizados.

Realizado a instalação dos implantes e decorridos 30 e 90 dias de observação, os animais foram sacrificados através de overdose de anestésico e as mandíbulas seccionadas para obtenção da região mentoniana, contendo

os implantes. Fixaram estes espécimes em solução de formol (10%) tamponado, mantiveram-nos a 4°C para pré-fixação por 48 horas e em seguida foram levados ao laboratório e preparados para o devido processamento histológico.

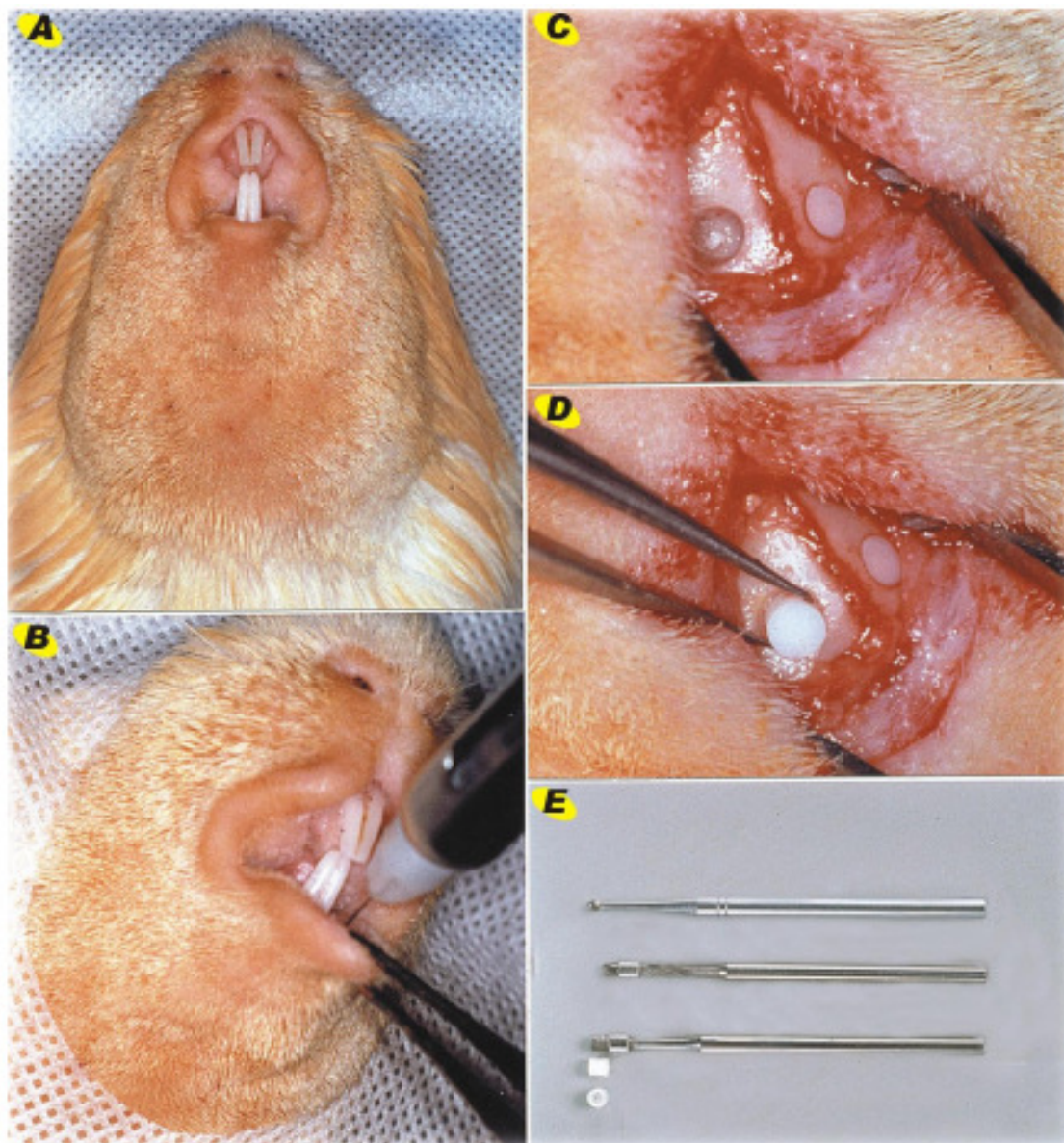


Figura 1 – Ilustração da metodologia de implante intra ósseo, onde se observa:

A – tricotomia e assepsia com álcool iodado, B – instalação de campo cirúrgico fenestrado e anestesia suprapariosteal, C e D – lojas ósseas e posicionamento dos implantes, E- brocas especiais e copos de Teflon®

4.3 Procedimento laboratorial

4.3.1 Preparo histológico

Após a fixação, os blocos foram por 12 horas em água corrente, sendo que em seguida, os mesmos descalcificados com solução aquosa de ácido nítrico a 5%. A desidratação foi realizada mergulhando os espécimes em solução de álcool etílico, em concentração crescente de 50%, 70%, 90% e absoluto. Posteriormente, procedeu-se a inclusão dos espécimes em parafina (Paraplast®) para a confecção de 24 lâminas com 144 cortes histológicos semi-seriados, estando o micrômetro regulado para cortes de 5 micrômetros (Lupe® modelo MRP 03 –Brasil). Realizaram-se os cortes em planos paralelos à direção de entrada do copo, visando à exposição da interface do contato do material com o tecido ósseo. A técnica de coloração foi realizada utilizando-se a hematoxilina e eosina. Após o processamento de rotina, as lâminas passaram por uma avaliação em microscopia óptica.

4.3.2 Critério histológico

A interface na abertura do copo, entre o material que está sendo testado e o osso, foi a área avaliada.

Como controle, observaram-se as interfaces laterais entre o copo de Teflon® e o osso contíguo, pois esta área reflete o trauma causado pelo procedimento cirúrgico durante a inserção deste copo, sendo este material considerado inerte. (figuras 3-A, 4-D e 7-A)

Foram anotadas as seguintes observações:

1. A presença ou ausência de necrose;
2. A frequência e intensidade de células inflamatórias agudas e crônicas-neutrófilos, linfócitos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos e células gigantes de corpo estranho;
3. A possível reabsorção do material e o preenchimento do copo por osso;
4. Atividades osteolítica, osteoclástica ou osteoblástica;
5. Degeneração e desintegração de células inflamatórias;
6. Transporte do material à distância em vasos e células;
7. Alterações em vasos e nervos.

As reações inflamatórias foram classificadas em suave, moderada e severa.

- **Reação inflamatória suave:** A designação de inflamação suave deu-se aos espécimes que mostraram poucas células inflamatórias, na maioria linfócitos e plasmócitos e o tecido ósseo com características histológicas identificáveis;
- **Reação inflamatória moderada:** A designação de inflamação moderada deu-se aos espécimes que mostram acúmulo focal de células inflamatórias, mas sem tecido necrótico. Entretanto, poderia haver desarranjo das características histológicas do tecido ósseo;
- **Reação inflamatória severa:** Esta designação deu-se aos espécimes que mostram substituição do tecido ósseo por tecido inflamatório. Avaliou-se também, a extensão e o tipo necrótico, por exemplo, liquefação ou coagulação.

4.3.3 Requisitos histológicos

O plano de corte histológico deve passar pela abertura do copo, incluindo toda a interface entre o material e o osso. Os cortes histológicos não devem conter artefatos histológicos que prejudiquem a avaliação.

Experimentos, testes ou controles que resultaram em cortes que não preencheram estes requisitos foram repostos.

4.3.3.1 Critério de Avaliação

A severidade da resposta celular decidiu a aceitabilidade ou não dos materiais. Esta foi alcançada através do registro dos achados, de acordo com o critério FDI e ANSI/ADA a seguir:

- a) Reação inflamatória suave: Aos 30 dias após a realização do implante, há ausência inflamatória ou mínima inflamação presente. O tecido ósseo está organizado, com inflamação na área de abertura do copo, comparável àquela ao longo das paredes externas do copo. Ausência de reabsorção óssea. Aos 90 dias a reação tecidual, na abertura do copo, é comparável àquela ao longo de sua periferia. O tecido está bem organizado com total regeneração óssea, ausência completa de inflamação e, possivelmente presença de algumas células de corpo estranho.
- b) - Reação inflamatória moderada: Aos 30 dias de implante, há alguma inflamação na entrada do copo e nenhuma ou mínima, na sua periferia. O tecido adjacente ao material testado terá mantido sua estrutura, contendo linfócitos, plasmócitos, macrófagos e ocasionalmente células gigantes de corpo estranho, mas sem acúmulo de neutrófilo. Reabsorção óssea suave poderá estar presente. Aos 90 dias, há a presença de algumas células inflamatórias, linfócitos, macrófagos e ocasionalmente células gigantes de corpo estranho na

entrada do copo, com o osso regenerado e tecido fibroso ao longo da sua periferia. O tecido, na abertura do copo, está organizado, mas contém acúmulo de linfócitos, plasmócitos e macrófagos (inflamação crônica). Reabsorção óssea poderá estar presente.

- c) - Reação inflamatória intensa: Aos 30 dias há uma reação inflamatória distinta na abertura do copo, quando comparada com sua periferia. O tecido está pobremente organizado e contém acúmulo de neutrófilos. Reabsorção óssea poderá estar presente. Aos 90 dias, há uma reação inflamatória distinta na abertura do copo, com osso regenerado e tecido fibroso ao longo de sua periferia. O tecido, na abertura do copo, está organizado, mas contém acúmulo de linfócitos, plasmócitos e macrófagos (inflamação crônica). Reabsorção óssea poderá estar presente.

4.3.3.2 Interpretação

A interpretação dos resultados foi realizada através da análise dos dados obtidos, demonstrando a aceitação ou rejeição do material, baseando-se no seguinte:

- Nenhuma ou suave reação inflamatória nos dois períodos: **aceitável**.
- Nenhuma ou suave reação inflamatória aos 30 dias, que aumente no período subsequente para moderada ou severa: **não aceitável**.
- Reação moderada aos 30 e 90 dias: **não aceitável**.
- Reação moderada aos 30 dias, que diminui aos 90 dias: **aceitável**.
- Reações severas em qualquer período: **não aceitável**.

5 RESULTADOS

5.1 Controle Negativo – Zona de Teflon®

Avaliação de 30 e 90 dias

Considera-se que a resposta biológica provocada pela interface do copo de Teflon®, não adjacente ao material estudado, apresenta-se como uma reação inflamatória de baixa intensidade, sendo então padronizada como controle negativo para a metodologia empregada definida no item 4.12.10, pág. 175 do FDI Technical Report Nº 9 (1980). São achados rotineiros a justaposição de tecido ósseo em torno do copo e sua total inclusão com uma reação que caracteriza-se como uma evolução dinâmica do processo de reparo, evidenciando a neoformação óssea já aos 30 dias (Figura 4), com maior quantidade aos 90 dias. (Figura 5)

Esse tecido ósseo, caracterizado pela normalidade, estabilidade e sem sinais de reabsorções ou necrose, teve seu crescimento em progressão à área de ranhuras laterais do implante e, quando não em contato íntimo, o osso apresentou-se separado deste por uma fina camada de tecido conjuntivo, sem mostras de reação inflamatória. (Figura 4-A em maior aumento figura 4-D) Esses achados histológicos, como rotina, foram uma constante presentes nos espécimes avaliados, evidenciando a biocompatibilidade do Teflon®.

5.2 Avaliação de biocompatibilidade dos MTA's:

O número de implantes intra-ósseo e a avaliação da reação do tecido frente ao material testado encontram-se expressos nas tabelas 1 e 2, considerando os tempos de observação de 30 dias e 90 dias.

Tabela 1 – Período Experimental e número de implantes intra ósseo

Materiais	Período experimental	Número de Implantes intra ósseos
	(semanas)	
MTA – Branco	30 dias	10
ANGELUS®	90 dias	10
MTA – Cinza	30 dias	10
ANGELUS®	90 dias	10
MTA – Branco	30 dias	10
ProRoot®	90 dias	10
MTA – Cinza	30 dias	10
ProRoot®	90 dias	10

Tabela 2- Número de implantes intra ósseo e intensidade da resposta inflamatória

Resposta Inflamatória	MTA Cinza Angelus®		MTA Branco Angelus®		MTA Cinza ProRoot®		MTA Branco ProRoot®		CONTROLE	
	4s	12 s	4 s	12 s	4 s	12 s	4 s	12 s	4 s	12 s
Sem reação/suave	8	10	8	10	10	10	9	10	40	40
Moderado	2	-	2	-	-	-	1	-	-	-
Severo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	10	10	10	10	10	10	10	10	40	40

5.3 Avaliação histológica dos MTA's:

As ocorrências histopatológicas que se fizeram presentes com mais frequência são descritas na tabela 3, segundo o material e o tempo de observação de forma a evidenciar o caráter do processo inflamatório que se instalou nas duas fases experimentais.

As tabulações dos grupos celulares e eventos são resultados do agrupamento de todas as observações dos cortes histológicos avaliados, sendo que avaliações foram realizadas através de uma análise qualitativa, subjetiva, observando o aspecto geral do quadro inflamatório instalado.

Tabela 3 – Análise histológica dos materiais testados em 4 semanas e 12 semanas

Critério Histológico	MTA Cinza Angelus®		MTA Branco Angelus®		MTA Cinza ProRoot®		MTA Branco ProRoot®	
	4 s	12 s	4 s	12 s	4 s	12 s	4 s	12 s
Neutrófilos	x	x	x	x	x	x	x	x
Macrofagos	x	x	x	x	x	x	x	x
Linfócitos	x	x	x	x	x	x	x	x
Células Plasmáticas	x	x	x	x	x	x	x	x
Células Gigantes do tipo corpo estranho	x	x	x	x	x	x	x	x
Material disperse	x	x	x	x	x	x	x	x
Cápsula	x	x	x	x	x	x	x	x
Neoformação óssea	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx
Reabsorção	x	x	x	x	x	x	x	x
Resposta Inflamatória	x	x	x	x	x	x	x	x
Tecido Necrótico	x	x	x	x	x	x	x	x

x Ausente/suave; xx Moderado; xxx Severo.

5.4 – Avaliação da resposta inflamatória:

Análise de quatro semanas

5.4.1 MTA - Branco Ângelus® e MTA – Cinza Ângelus®

As reações inflamatórias verificadas frente a estes dois materiais foram similares, sendo que em ambos, oito amostras tiveram o processo inflamatório caracterizado como ausente/suave (Figura 2 e Figura 4) e duas amostras apresentando reação inflamatória moderada. (tabela 2)

5.4.2 MTA - Branco ProRoot® e MTA – Cinza ProRoot®

Os dois materiais mostraram em sua análise de 4 semanas respostas inflamatórias que caracterizam uma reação suave/ausente para a maioria de suas amostras (Figura 6 e Figura 8). Apenas uma amostra, do MTA ProRoot branco, apresentou reação inflamatória moderada. (tabela 2)

Análise de doze semanas

5.4.3 MTA – Branco Ângelus® e MTA – Cinza Ângelus®

No período de 12 semanas todas as amostras apresentaram ausência de reação inflamatória, caracterizando assim, os dois materiais como biocompatíveis. Além da ausência de resposta inflamatória significativa, pode ser observado o crescimento ósseo em íntimo contato com os materiais e, quando não, no interior destes. (Figura 3 e Figura 5)

5.4.4 MTA – Branco ProRoot® e MTA – Cinza ProRoot®

A análise das respostas inflamatórias foram caracterizadas como ausentes/suaves em todos os espécimes no período experimental de 12 semanas, não havendo reação inflamatória significativa e quando presente, observou-se apenas presença isolada de macrófagos e células gigante do tipo corpo estranho na periferia. Além do que, verificou-se crescimento e aposição óssea em íntimo contato em ambos os materiais testados e, quando não, estes apresentavam-se separados apenas por uma tênue camada de tecido conjuntivo. (Figura 7 e Figura 9)

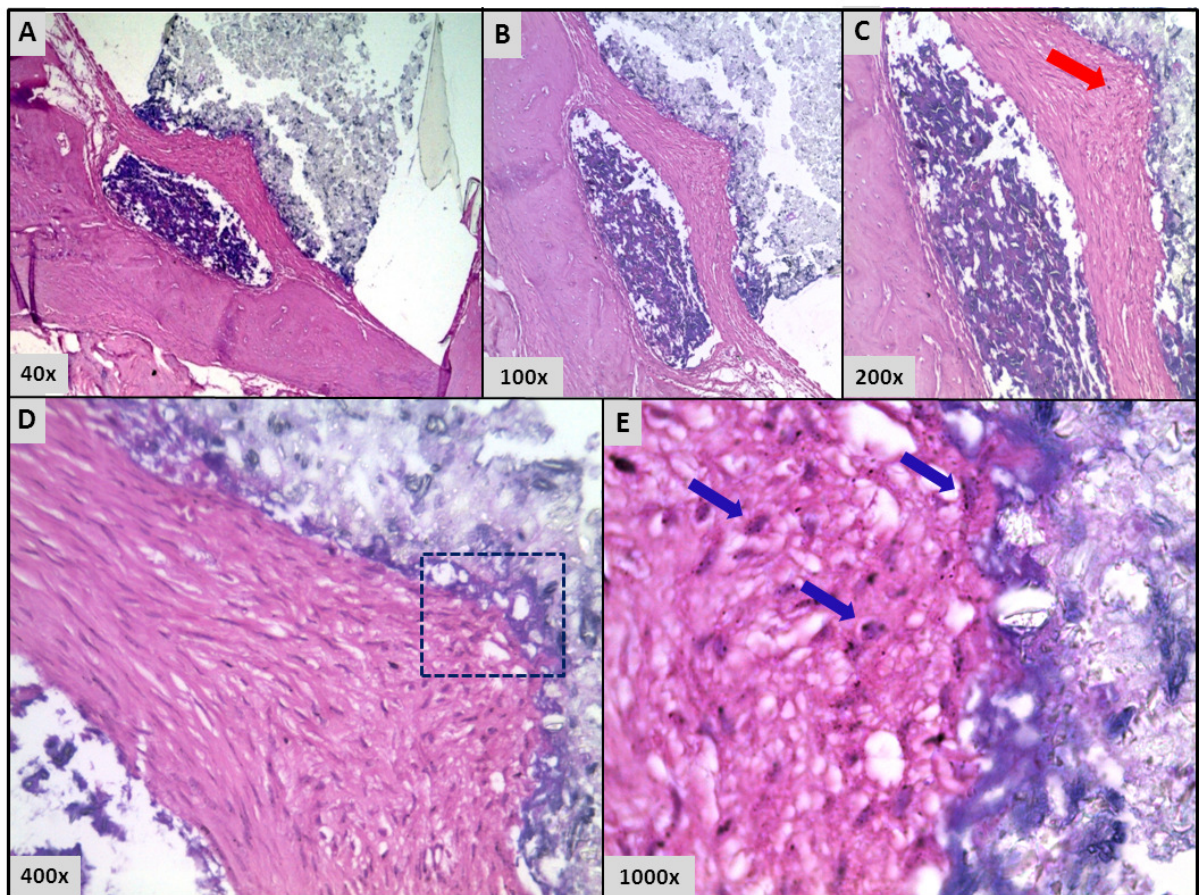


Figura 2 – MTA Ângelus Branco[®], 4 semanas

A - Visão geral do implante mostrando área ocupada pelo material testado e interface osso/material. (H&E, magnificação de 40x)

B e C– Magnificação da área da interface osso/material com parte do material deslocado e interposição de tecido conjuntivo denso hialinizado (➔) e tecido ósseo adjacente. (H&E, magnificação de 100x e 200x respectivamente)

D- Detalhe da imagem B e C(1/3 médio da entrada do implante) evidenciando o íntimo contato do tecido conjuntivo fibroso ao material sem presença de células inflamatórias. (H&E, magnificação de 400x)

E- Detalhe de D () mostrando em maior aumento um tecido conjuntivo denso com a presença de diferenciação celular, com presença de osteóblastos na matriz conjuntiva (➔), em íntimo contato com o material testado. (H&E, magnificação de 1000x)

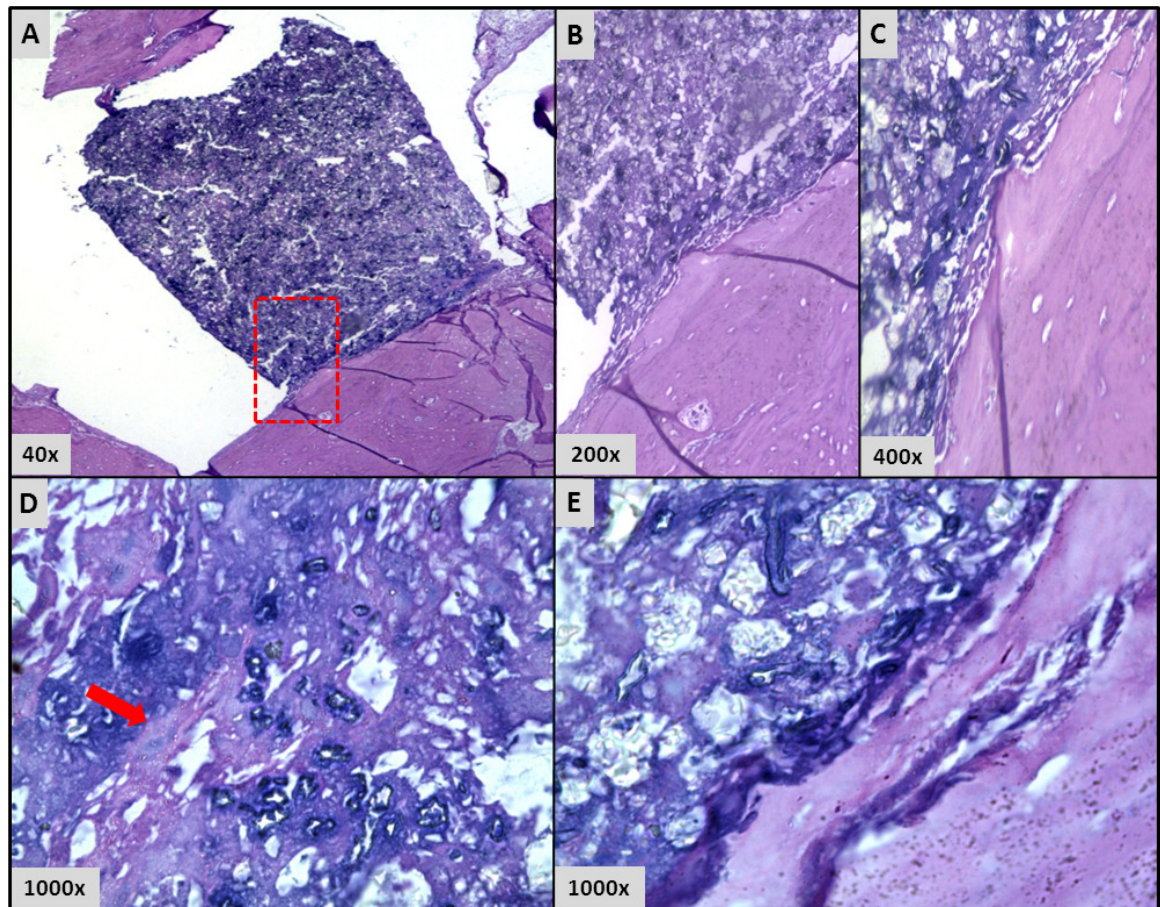


Figura 3 – MTA Ângelus Branco®, 12 semanas

A – visão geral do implante em íntimo contato com o material. (H&E, magnificação de 40x)

B e C – Maiores aumentos da região a ser avaliada(), onde pode ser verificado o íntimo contato material/osso. Ausência de tecido conjuntivo interpondo a estes. (H&E, magnificação de 200x e 400x respectivamente)

D – Grande aumento mostrando o crescimento de tecido ósseo entre o material testado (➔). (H &E, magnificação de 1000x)

E – Grande aumento onde pode ser observado tecido ósseo na intimidade do material. (H &E, magnificação de 1000x)

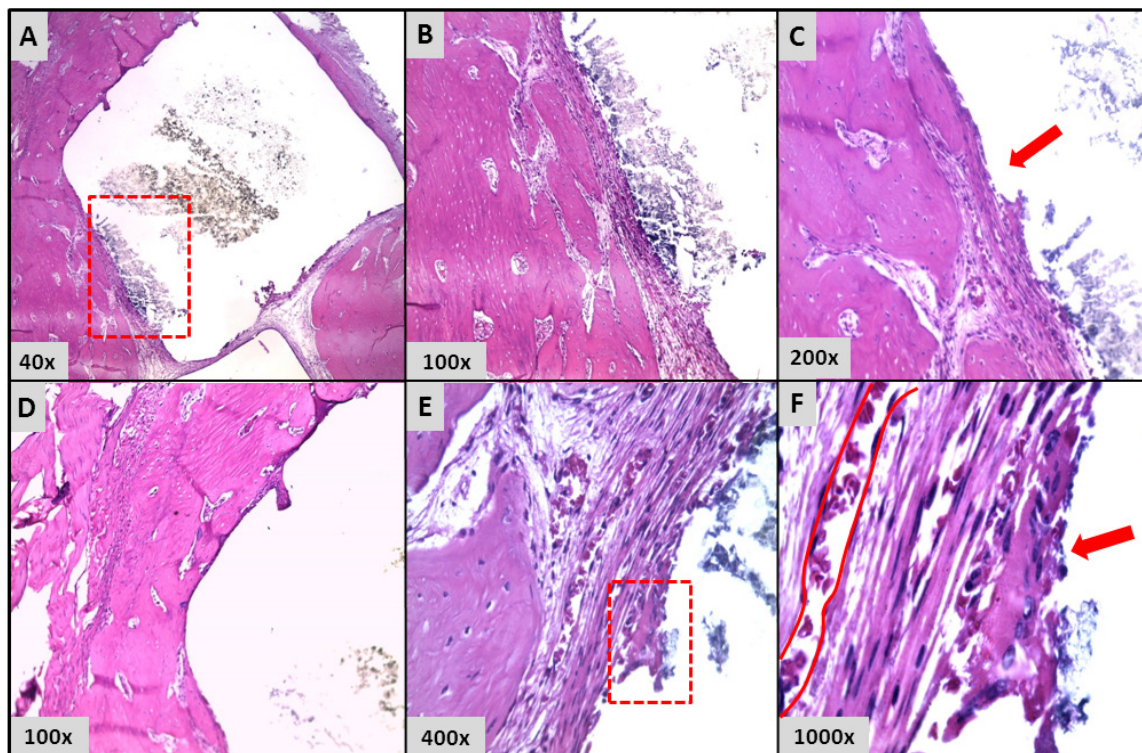


Figura 4 – MTA Ângelus Cinza[®], 4 semanas

A – Visão geral do implante mostrando área ocupada pelo material testado e interface material/ tecido.() (H&E, magnificação de 40x)

B e C– Maior aumento da área da interface osso/material, sendo que na imagem C se vê em detalhes uma delgada faixa de tecido conjuntivo interpondo uma camada de matriz mineralizada imatura (➔). (H&E, magnificação de 100x e 200x respectivamente)

D – Maior ampliação de área da imagem A (seta) dando ênfase à interface copo de teflon/osso ; região utilizada para controle. Mostra um preenchimento das ranhuras do copo com tecido ósseo neoformado (//). (H&E, magnificação de 100x respectivamente)

E e F – Maiores aumentos evidenciando a presença de tecido conjuntivo fibroso entre material e tecido ósseo. Presença de vasos sanguíneos hiperêmicos e também de células gigantes do tipo corpo estranho em contato com o material testado (➔). (H&E, magnificação de 400x e 1000x respectivamente)

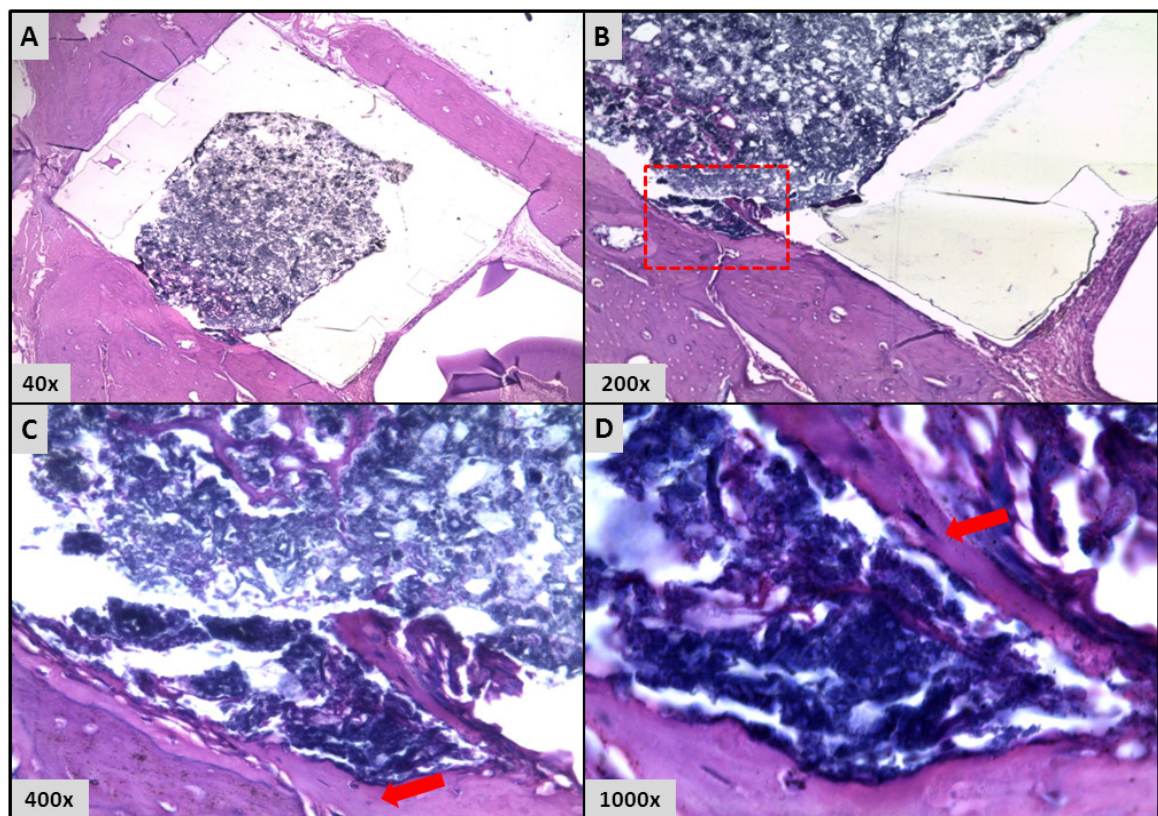


Figura 5 – MTA Ângelus Cinza[®], 12 semanas

A – visão geral do implante onde se observa inclusão total do copo de teflon, com formação óssea em toda sua extensão. Material testado em íntimo contato com osso adjacente. (H&E, magnificação de 40x)

B – magnificação da região de transição copo de teflon, material testado (). Osso justaposto ao teflon e em íntima relação do material com osso neoformado. (H&E, magnificação de 200x)

C- e D- Nota-se crescimento de tecido ósseo por entre o material testado (→), íntima relação destes e nenhuma área com presença de infiltrado inflamatório. (H&E, magnificação de 400x e 1000x respectivamente)

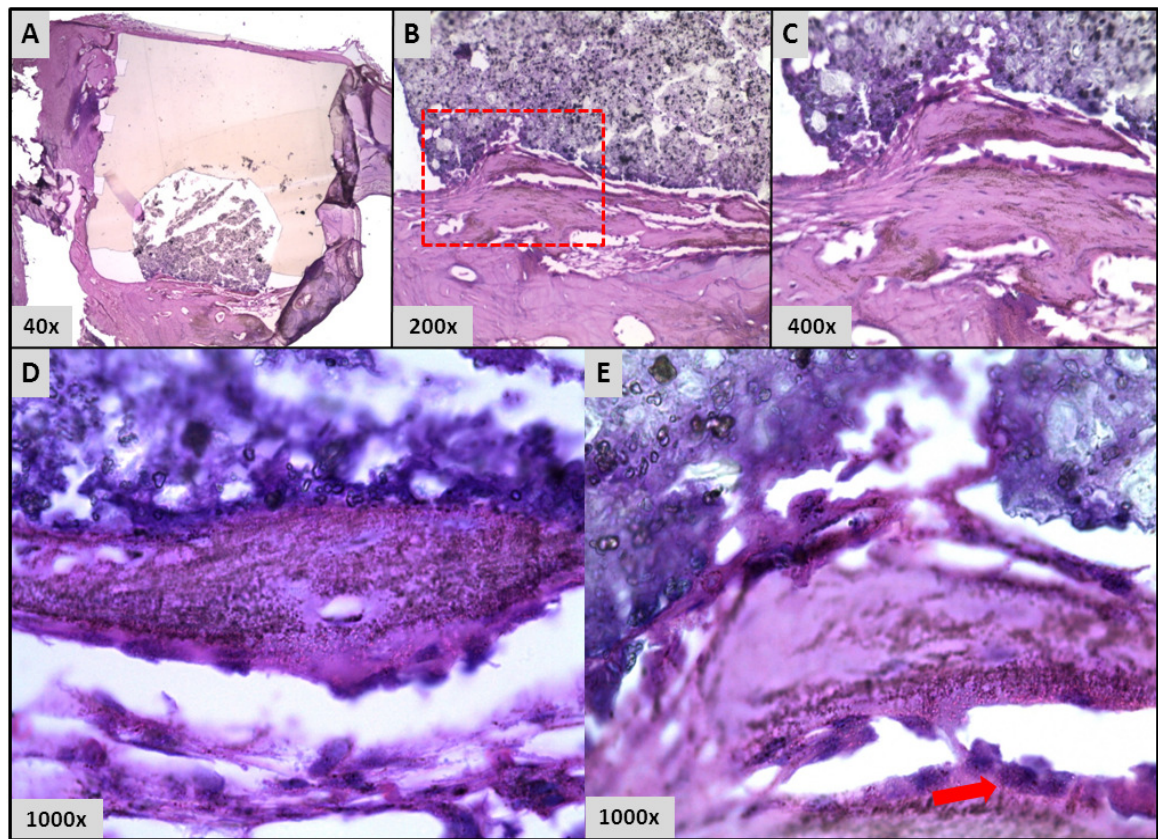


Figura 6- ProRoot Branco[®], 4 semanas

A – Visão geral do implante mostrando área ocupada pelo material testado e o contato direto material / tecido. (H&E, magnificação de 40x)

B e C – Maior aumento () mostrando uma delgada camada de tecido conjuntivo fibroso, sem a presença de células inflamatórias. (H&E, magnificação de 100x e 200x respectivamente)

D – Imagem mostrando crescimento de tecido ósseo justaposto ao material testado. Não há presença de resposta inflamatória. (H&E, magnificação de 400x)

E – Magnificação de D, mostrando íntima relação do tecido ósseo neoformado com o material testado evidenciando espaços medulares e células osteoblásticas com aspectos morfológicos de normalidade (➔). (H&E, magnificação de 1000x)

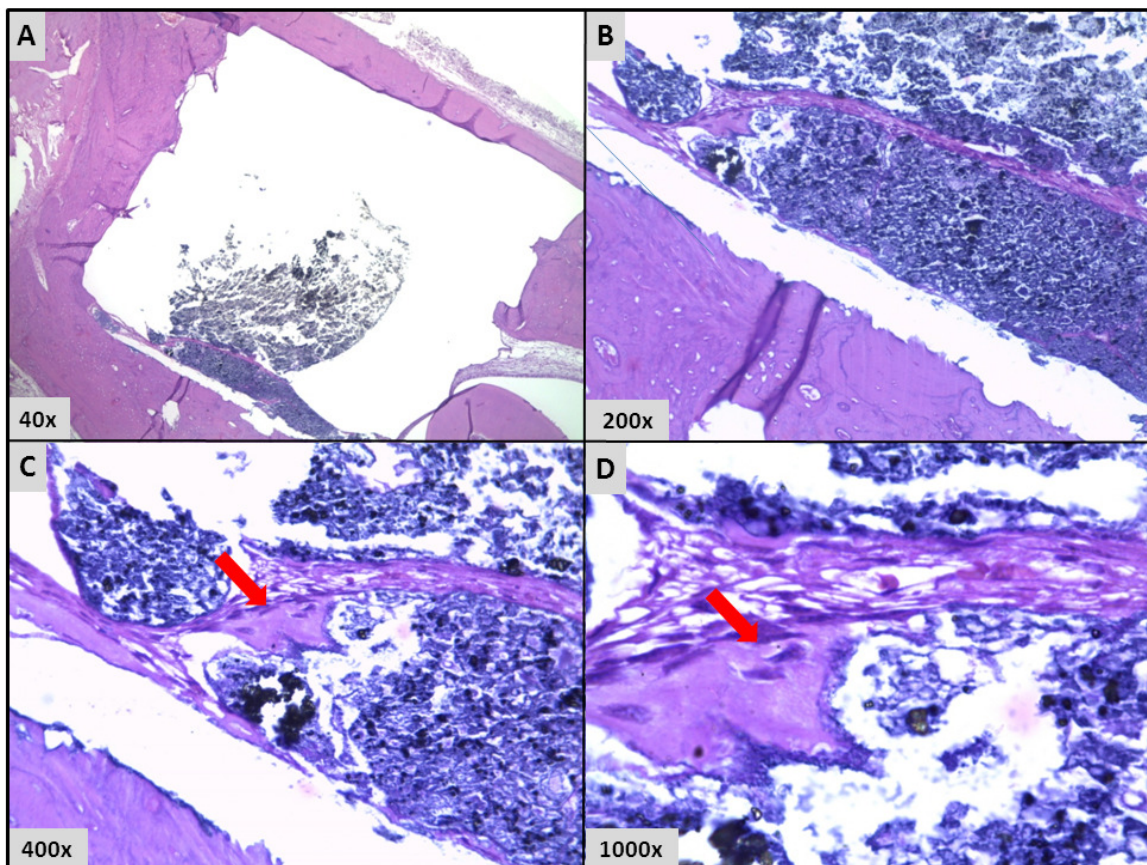


Figura 7 - MTA ProRoot® Branco, 12 semanas

A - Visão geral do implante mostrando o crescimento de tecido mineralizado para dentro do mesmo, além de crescimento de tecido ósseo sadio na região circunvizinha (H&E, magnificação de 40x)

B e C – Maiores aumentos da interface osso/material, mostrando o íntimo contato o tecido neoformado com o material testado. A imagem C evidencia com maior detalhe a capacidade de formação óssea por entre as partículas do material(➡). (H&E, magnificação de 100x e 400x)

D – Presença de osteoblastos (➡) e formação de espaços medulares, sem a presença de células inflamatórias. (H&E, magnificação de 1000x)

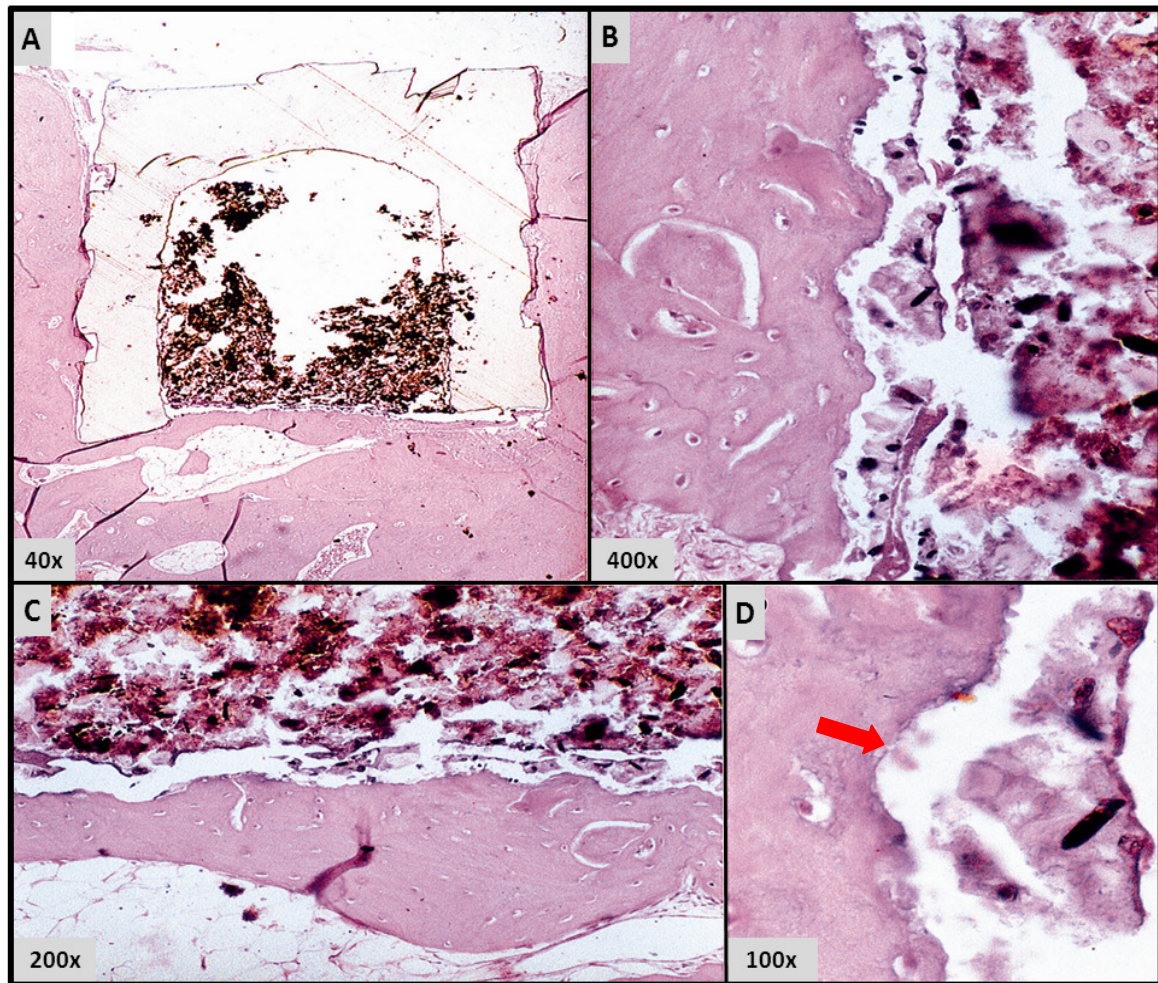


Figura 8 -MTA ProRoot Cinza[®], 4 semanas

A – Visão geral do implante mostrando área de interface osso/material testado. (H&E, magnificação de 40x)

B – Imagem mostrando a íntima relação entre o material testado e o tecido mineralizado imaturo. Não se evidencia a presença de células inflamatórias ou áreas de reabsorção. (H&E, magnificação de 200x)

C e D – Maiores aumentos mostrando áreas de formações medulares com a presença significativa de osteoblastos na periferia (➔). (H&E, magnificação de 400x e 1000x respectivamente)

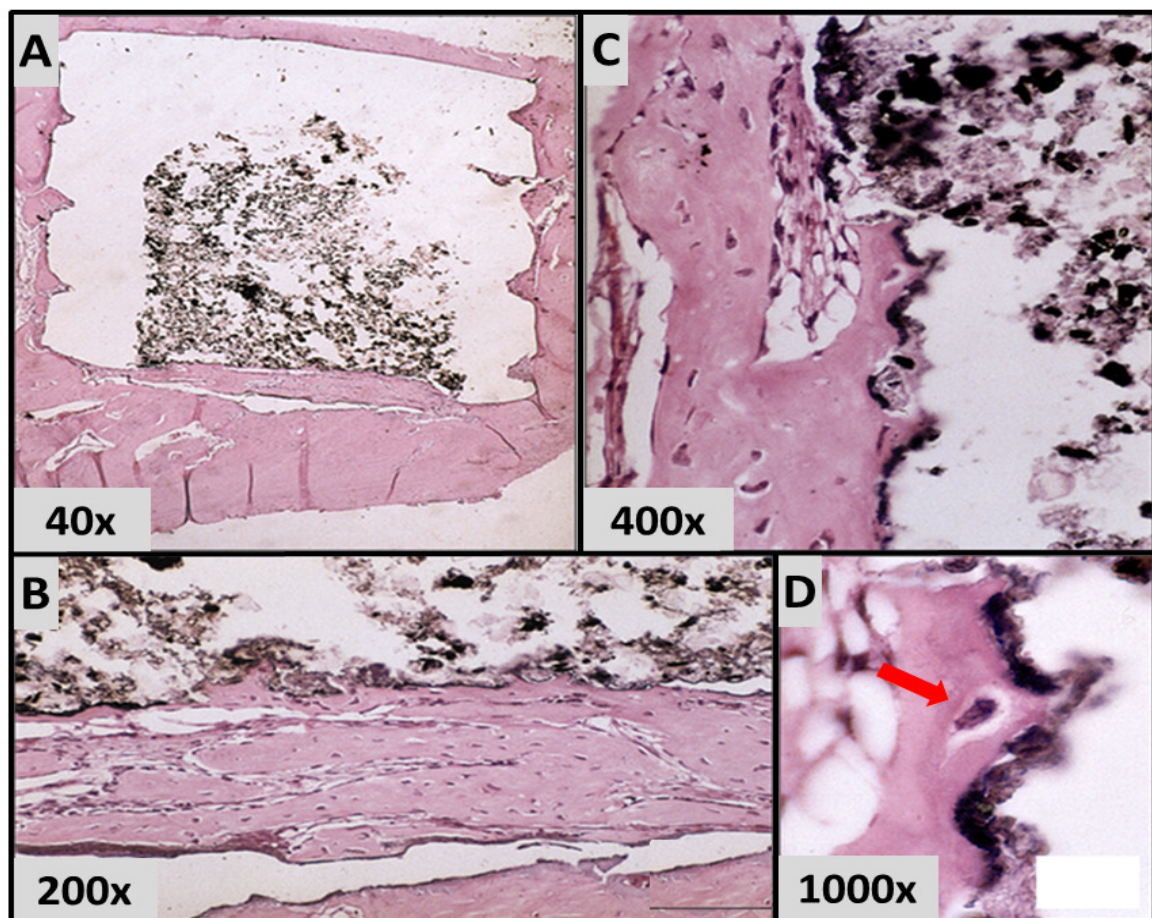


Figura 9 - MTA ProRoot Cinza®, 12 semanas

A – Visão geral do implante circundado por tecido ósseo sadio (H&E, magnificação de 40x)

B – Imagem evidenciando a ausência de células inflamatórias na interface osso/material. (H&E, magnificação 200x)

C- Maior aumento mostrando um íntimo contato entre osso e material testado sem resposta inflamatório. (H&E, magnificação de 400x)

D – Maior aumento mostrando um osteoblasto com aspecto morfológico de normalidade(➔), e um tecido ósseo em intimo contato com o material sem a presença de infiltrado inflamatório. (H&E, magnificação de 1000x)

6. DISCUSSÃO

As cirurgias parendodônticas, conceituadas por Bramante e Berbet (1990) como sendo um procedimento realizado para resolver dificuldades provenientes de um tratamento endodôntico ou não solucionáveis por ele em decorrência da complexidade anatômica dos canais, tem o seu sucesso diretamente ligado a completa remoção dos agentes irritantes físicos e/ou bacterianos e no retropreparo das cavidades radiculares seguido de suas obturações com um material específico. (Orso & Filho 2006).

Conforme Murphy et al. (1991) as lesões periapicais sob intervenção não cirúrgicas, regredem em 46,5% dos casos e mostram resolução parcial em 48,3% após três meses de acompanhamento. Em um ano de observação estes casos parcialmente resolvidos mostram regressão em 70,6% demonstrando que o exame prévio ao ato cirúrgico é imprescindível e, somente se deve lançar mão deste ato operatório, quando se exaurirem alternativas conservadoras.

A procura de um material que possua propriedades físico-químicas ideais para a proteção do complexo dentina polpa e regiões periapicais, tem sido uma constante no meio científico. O material odontológico, em especial aqueles utilizados em cirurgias parendodônticas, que permanecerão em contato permanente com o tecido ósseo, tem no seu potencial de biocompatibilidade a referência para sua aplicação clínica. Para tanto, estes materiais retro-obturadores, além de testes preliminares indispensáveis, devem ter investigadas suas características de biocompatibilidade (Torabinejad & Pitt Ford; 1996)

6.1 Metodologia

O propósito deste trabalho foi comparar a reação do tecido ósseo quando nele se implanta o MTA de diferentes composições e marcas comerciais, contribuindo dessa forma com a busca de um material mais

adequado e próprio para a utilização em obturações retrógradas em cirurgias parodontodônticas. A falta de padronização dos métodos de pesquisa e consenso entre pesquisadores torna essa tarefa difícil e trabalhosa, uma vez que a padronização dos testes de biocompatibilidade é um requisito importante e necessário para minimizar as variantes não delineadas e principalmente para que os resultados obtidos possam ser utilizados na comparação com outros estudos. Os métodos utilizados por este estudo, assim como em outros (Spangberg 1973; Pascon et al. 1987 ; Barbosa et al. 1993; Torabinejad et al. 1998; Saidon et al. 2003; Souza et al. 2004) são recomendados pela FDI, através do Technical Report Nº 9, e permite, por meio de teste de implantação óssea em mandíbulas de *guinea-pigs*, a avaliação dos materiais considerando as recomendações dos fabricantes e a manutenção de suas características em uso clínico.

No entanto é oportuno esclarecer que não se pretendeu nem se preconizou que os implantes mimetizassem as situações clínicas, mas sim, apenas as investigações indicadas na proposição evitando extrapolações. Os resultados aqui obtidos mostram a reação do tecido ósseo de cobaias aos materiais testados, frente a um modelo experimental possível, compreendendo uma das etapas dos testes indicados pela Federação Dentária Internacional.

Embora exista uma predominância de trabalhos científicos que apresentam uma análise estatística dos dados resultantes, neste tipo de experimento essa análise somente seria válida quando a contagem de células encontradas em cada corte histológico, fossem a representação efetiva daquela resposta inflamatória. A interpretação individual do pesquisador não permite isso. A literatura mostra isso em alguns trabalhos, onde foi feita a tentativa de quantificar o número de cada um dos tipos celulares da inflamação, como no estudo de Leonardo et al. (1984), em que ao avaliarem quatro tipos de cimentos obturados endodônticos, aumentaram o campo histológico em 1.600x, projetando-o em uma tela de vídeo e por meio de uma análise morfométrica da área de entrada do copo os autores concluíram que ainda assim, não foi possível a obtenção de uma classificação consistente dos materiais e o grau de severidade estabelecido foi similar aos encontrados na

literatura por outros autores que usaram uma análise qualitativa descritiva. Outra tentativa de quantificação da reação inflamatória foi realizada por Langeland et al.(1988), em que avaliaram cimentos obturadores através de implantes intra ósseos. Esses autores fizeram traçados em 123 cortes histológicos demarcando a área de mm² da perda óssea nos diversos tempos de observação. Os seus resultados mostraram que a classificação da severidade da reação também foi semelhante às encontradas na literatura descritiva. Sendo assim, este estudo compactua com Pascon et al.(1991) que cita que: “embora fosse desejável obter os cortes histológicos ao acaso e deixar a difícil tarefa de contar células para os equipamentos, é obvio que isto não proporcionará um resultado mais adequado do que uma avaliação descritiva da resposta inflamatória em: suave, moderada ou severa em cortes histológicos corretamente cortados, alinhados e selecionados” e emprega uma análise qualitativa descritiva das reações inflamatórias frente ao osso em contato com os MTAs.

Na presente pesquisa as reações ao longo da periferia externa do copo de Teflon[®] foram usadas como controle, uma vez que refletem o trauma causado pelo procedimento cirúrgico necessário para a introdução do mesmo. O Teflon[®], por si só, causa uma reação inflamatória insignificante aos tecidos (Spangberg 1969, ADA 1982, Stanley 1985), verificado nos dois tempos experimentais através de uma neoformação óssea junto à superfície externa do copo, indicando um pequeno grau de estimulação de resposta inflamatória. Quando não ocorreu o contato direto com o osso, uma cápsula fibrosa de pequena espessura mostrou-se presente, entretanto, sem a presença de infiltrado inflamatório significativo. (Figuras 4-D, 7-A e 9-A)

Dois foram os tempos experimentais estabelecidos para o estudo, sendo de 30 dias e 90 dias após a implantação. Alguns estudos empregam períodos mais curto como 7 dias ou mais longo como 120 dias (Costa et al. 2003; Trindade et al. 2003; Vosoughhasseini et al. 2008). No período de 7 dias podem ocorrer, ainda, resquícios do trauma cirúrgico mascarando a verdadeira resposta do material. No período de 30 dias a reação tecidual já não sofre

qualquer interferência dos procedimentos cirúrgicos e os fenômenos reparatórios já estão definidos e no período de 90 dias estão consolidados.

6.2 Resultados

A presente investigação vem de encontro com a necessidade de comparar de forma simultânea e através da mesma metodologia os quatro tipos de MTAs disponíveis ao uso clínico, uma vez que a literatura pertinente ainda não provem de tal investigação.

Muitos estudos avaliam a desempenho do MTA em suas diferentes formulações, tanto o de composição cinza quanto o branco. No entanto, existem alguns conflitos nos dados apresentados quanto à sua biocompatibilidade. Perez et al. (2003) em um estudo *in vitro*, utilizando diferentes tipos celulares, postularam que o MTA branco (ProRoot®) não é tão biocompatível quanto o MTA cinza (ProRoot®), sendo esta diferença justificada, pelos autores, em consequência da variação morfológica da superfície desses materiais. Já Ribeiro et al. (2005), em um teste de alteração estrutural do DNA de células que foram colocadas em contato direto com o MTA cinza e branco, concluíram que os dois tipos oferecem a mesma resposta biológica e não relacionaram nenhum fator de genotoxicidade ou apoptose em nenhum tempo experimental. Coneglian et al.(2007) apresentaram resultados piores do MTA Branco (Ângelus®) em comparação ao MTA cinza em um estudo em que avaliaram o potencial de selamento apical. Parirokh et al. (2011) compararam o MTA cinza e branco (ProRoot®) em um estudo *in vivo*, e apesar de considerarem que ambos os materiais são biocompatíveis, apresentaram melhores resultados para o MTA cinza, que mostrou menor extensão de inflamação aos 30 dias de experimento. Esses dados contradizem o estudo prospectivo de Saundres et al. (2008) que indica o MTA branco (ProRoot) em vedamento apical associado às técnicas microcirúrgicas, bem como o estudo de Stefopoulos et al.(2008) que constatou a equidade na eficiência de

selamento do MTA branco e cinza (ProRoot[®]) quando usados como barreira apical em dentes com ápices incompletos, apontando apenas uma melhor performance do MTA branco quando previamente utilizou-se medicação de hidróxido de cálcio. Storm et al. (2008) também apontam uma tendência ao emprego do MTA branco em decorrência de sua menor expansão (0,1%) em relação ao MTA cinza (1%).

Os resultados apresentados neste estudo mostram uma similaridade de comportamento frente ao osso, ressaltando o seu caráter de biocompatibilidade junto aos tecidos periapicais, uma vez que verificou-se uma mínima reação inflamatória nas primeiras 4 semanas e um reparo tecidual consistente na 12^a semana.

Estes resultados são comparáveis aos estudos de Holland et al. (2002) e Camilleri et al. (2004) em que a resposta tecidual frente aos diferentes tipos de MTAs se assemelham e mantêm a premissa de que o MTA, independentemente do tipo, tem um grande potencial de reparação óssea, encorajando e suportando novos estudos como o estudo de Gomes-Filho et al. (2011) que avaliam, *in vivo*, a performance do MTA fotopolimerizável e o de Gandolfi et al. (2011) que associou o MTA ao fluoreto de sódio em escalas nanométricas, potencializando a bioatividade de formação de apatita sugerindo o uso clínico desse novo composto tanto na endodontia quanto na cirurgia oral.

A comparação dos vários materiais dentro de uma mesma metodologia tranquiliza-nos quanto à confiabilidade dos resultados ao minimizarmos as variáveis individuais dos diversos autores consultados, como, animal, tempo e tipo de avaliação.

Assim, nossos resultados somam-se aos dos autores citados, oferecendo subsídios, quanto à avaliação biológica, demonstrando a baixa capacidade irritacional de todos os MTAs presentes no mercado para o uso em cirurgias endodônticas, substanciando ainda mais o seu uso na prática clínica.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos e levando em consideração os limites da metodologia empregada, é possível concluir do ponto de vista biológico que:

- ✓ O MTA independentemente de sua marca comercial, confirma seu caráter de biocompatibilidade frente ao tecido ósseo
- ✓ Todos os materiais apresentaram os mesmos níveis de resposta inflamatória
- ✓ A modificação existente entre o MTA branco e cinza não altera o processo de reparo ósseo

8. REFERÊNCIAS

- 1- Abbasipour F, Rastqar A, Bakhatiar H, Khalikhani H, Aeinehchi M, Janahmadi M. The nociceptive and anticeptive effects of white mineral trioxide aggregate. **Int. End. J.** 2009; (42):794-01.
- 2- American Dental Association/ American National Standards Institute. Document nº41 for recommend standard practices for biologic evaluation of dental materials. **Council of Dental Materials and Devices**, 1982.
- 3- Ascary S., Parirokh M, Eghbal MJ, BappSc FB. Chemical difference between White and Gray Mineral Trioxide Aggregate. **J. Endodontics**, 2005; (31)2: 101-03.
- 4- Baek S, Lee WG, Setzer FG, Kim S. Periapical Bone Regeneration after Endodontic Microsurgery with Three Different Root-end Filling Materials: Amalgama, SuperEBA, and Mineral Trioxide Aggregate, **J. of Endodontics**. 2010; (36)8: 1323-25.
- 5- Bernabé PFE, Holand R Cirurgia Paraendodontica. In: Estrela C. **Ciência Endodôntica**, 2 ed. São Paulo: Artes Médicas Ltda; 2004. P. 657-797.
- 6- Bodrumlu E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: review. **Australian Endodontics Journal**. 2008; (34): 30-35 *Apud* Pelliccioni GA, Ciapetti G, Cenni E. Evaluation of osteoblast-like cell response to Proroot MTA (mineral trioxide aggregate) cement. **J Mater Sci Mater Med**. 2004; (15): 167–73.
- 7- Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral Trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. **Int Endod J**. 2006; (39): 747-45.
- 8- Camilleri J, Mallia B. Evaluation of the dimensional changes of mineral trioxide aggregate sealer. **Int Endod J**. 2011; (44): 416-24.

- 9- Coneglian PZA, Orosco FA, Bramante CM, Moraes IC, Garcia RB, Bernardineli N. *In vitro* sealling ability of White and Gray Mineral Trioxide Aggregate (MTA) and Portland Cement used as apical plugs. **J of App Oral Science** 2007; (15): 181-85.

- 10- Cristiansen R, Kirkevang LL, Horsted, Bindslev P, Wenzel A. Randomized clinical trial of root-end resection followed by root-end filling with mineral trioxide aggregate or smoothing of the orthograde gutta-percha root filling – 1 year follow-up. **Int Endod J.** 2009; (42): 105-14.

- 11- Deal BF, Wenckus CS, Johnson BR, Fayad MI. Chemical and physical properties of MTA, Portland cement and a new experimental material, fast-set MTA. **J Endod.** 2002; (28)3: 252 (abstract)

- 12- Fuentes UR, Wallace JA, Fachtman FW. A comparative analysis of Mineral Trioxide Aggregate and Portland cement. **J. Endod.** 2002; (28)3: 259.

- 13- Gandolfi MG, Taddei P, Siboni F, Modena E, Ginebra MP, Prati C. Fluoride containing nanoporous calcium-silicate MTA cements for endodontics and oral surgery: early fluorapatite formation in a phosphate-containing solution. **Int Endod J.** 2011; (44): 938-49.

- 14- Gartner AH, Dorn SO. Advances in endodontics surgery. **Dent Clin North Am**, 1992; (36)2: 357-79.

- 15- Gomes-Filho JE, Costa MMT, Cintra LTA, Duarte PCT, Takamiya AS, Lodi CS, Bernabé PFE. Evaluation of Rat Alveolar Bone Response to Angelus MTA or Experimental Light-cured Mineral Trioxide Aggregate Using Fluorochromes. **J. End.** 2011; (37)2: 250-54.

- 16- Hellwig I, Cancino CMH, Vanzin ACM, Weber JBB, Oliveira MG. Análise Comparativa da Microinfiltração Marginal em Retrobturações com MTA

e Cimento de Ionômero de Vidro. **Stomatos Rev de Odont da Ubra**. 2007; (13)25: 103-12.

17- Holland R. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral, Portland cement or calcium hydroxide. **Braz Dent J**. 2001; (12)1: 3 – 8

18- Holt GM, Dumsha TC. Leakage of amalgam, composite and Super-EBA, compared a new retrofill material bone cement. **J Endod**. 2000; (26)1: 29-31.

19- Huang TH, Yang CC, Ding SJ, Yeng M, Kao CT, Chou MY. Inflammatory Cytokines Reaction Elicited by Root-End Filling Materials. **J Biomed Mater Res**. 2005; (73): 123-28.

20- Langeland K, Pascon EA, Louw NP, Zhang XZ. Quantitative ranking of biocompatibility of endodontic sealing materials. **J Dent Res**. 1988; 67:780. Resumo

21- Leonardo MR, Pascon EA, Langeland K. Tissue reaction to endodontic materials: A morphometric approach. **J Dent Res**. 1984;63:286. Resumo

22- Minamikawa H, Deyama Y, Nakamura K, Yoshimura Y, Kaga M, Suzuki K, et.al. Effect of Mineral Trioxide Aggregate on Rat Clonal Dental Pulp Cells: Expression of Cytochrome P-450 and Inflammation-related Protein via Nuclear Factor Kappa B Signaling System. **J Endod**. 2009; (35)6: 843-46.

23- Parajpe A, Zhanc H, Johnson JD. Effects of Mineral Trioxide Aggregate on Human Dental Pulp Cells after Pulp. Capping Procedures. **J Endod**. 2010; (36)6: 1042-47.

24- Parirokh M, Mirsoltani B, Raoof M, Tabrizchi H, Haghdoost AA. Comparative study of subcutaneous Tissue response to a novel root-end filling material and white and grey mineral trioxide aggregate. **Int Endod J**. 2011; (44): 283-89.

- 25- Pascon E A, Leonardo MR, Safavi K, Langeland K. Tissue reactions to endodontic materials: method, criteria, assessment and observations. **Oral Surg, Oral Med and Oral Pathology**.1991;72(2):222-237.
- 26- Reyes-Carmona JF, Santos AS, Figueiredo CP, Baggio CH, Felipe MCS, Felipe WT, et.al. Host-Mineral Trioxide Aggregate Inflammatory Molecular Signaling and Biomineralization Ability. **J Endod**. 2010; (36)8: 1347-53.
- 27- Rezende TMB, Vargas DL, Cardoso FP, Sobrinho APR, Vieira LQ. Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. **Int Endod J**. 2005; (38): 896-03.
- 28- Ribeiro DA, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques, MEA, Saludori DMF. *In vitro* biocompatibility testes of two comercial types of mineral trioxide aggregate, **Bras Oral Res**. 2005; (19): 183-87.
- 29- Saunders WP. A Prospective Clinical study of Periradicular Surgery Using Mineral Trioxide Aggregate as Root and Filling. **J Endod**. 2008; (34)6: 660-65.
- 30- Saidon J, Safari JHK, Spangberg LS. Tissue reaction to implanted Mineral Trioxide Aggregate. **J Endod**. 2002; (28)3: 247 (abstract).
- 31- Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangber LSW. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. **Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod**. 2003; (95): 483-89.
- 32- Santos AD. **Estudo de propriedades físicas e químicas de um novo cimento selador endodontico**. [dissertação] Ilha Solteira: Faculdade de Engenharia/UNESP; 2004. Shánchez AFY, Iecoi. Berrocal MI, Gonzalez JMM. Metaanalysis of filler Materials in periapical surgery. **Med. Oral Patology Cir**

Bucal. 2008; (13)3: 180-85. Schwartz R. Trióxido Mineral Agregado: um novo material para endodontia. **JADA.** 1999; (2)5: 44-51.

33- Schimitt D, Lee J, Bogen G. Multifaceted use of ProRoot MTA root canal repair material. **Pediat. Dent.** 2001; (23)4: 326-30.

34- Sousa CJA, Loyola AM, Versiani MA, Biffi JCG, Oliveira RP, Pascon EA. A comparative histological evaluation of the biocompatibility of materials used in apical surgery. **Int Endod J.** 2004; (37): 738-48.

35- Spangberg LS. - Biologic effects of root canal filling materials. **Odonto Rev.** 1969; (20): 123-32.

36- Stefopoulos S, Tsatsas DV, Kerezoudis NP, Eliades G. Comparative *in vitro* study of the sealing efficiency of white vs grey ProRoot mineral trioxide aggregate formulas as apical barriers. **Dental traumatology** 2008; (24): 207-13.

37- Storm B, Eichmiller FC, Tordik PA, Goodell GG. Setting Expansion of Gray and White Mineral Trioxide Aggregate and Portland Cement. **J Endod.** 2008; (34)1: 80-82.

38- Tabarsi B, Parirokin M, Eghbal MJ, Haghdooost AA, Torabzadeh H, Asgary S. A Comparative study of dental pulp response to several pulp polony agents. International. **Endod J.** 2010; (43): 565-71.

39- Technical Report nº 9 F.D.I. Langeland, K.; Cotton, W.R. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. **Int Dent J.** 1980; 30(2): 140-88.

40- Torabinejad M, Watson TF, Pittt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide end filling material. **J Endod.** 1993; (19)12: 591-95.

- 41- Torabinejad M, Hong GU, Mc Donald F, Pitt Ford TR. Physical and Chemical properties of new reat-end filing material. **J Endod.** 1995; (21): 349-5.
- 42- Torabinejad M, Higa RK, Mckendty DJ, Pitt Ford TR. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. **J Endod.** 1994; (20): 159-63.
- 43- Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering ID, PittFord TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root- end filling material. **J Endod.** 1995b; (21)3: 109-12.
- 44- Torabinejad M, Smith PW, Keterring JD, Pitt Fordl TTR. Comparative investigation of material adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root- end filling materials. **J Endod.** 1995c; (21)6: 295-99.
- 45- Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Citotocixity of four root end filling materials. **J Endod.** 1995d; (21)10: 489-92.
- 46- Torabinejad M, Pitt Ford, TR, Mckendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Karyawasan SP. Histologic assessiment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys . **J Endod.** 1997; (23)4: 225-28.
- 47- Torabinejad M, Pitt Ford TR, Abedi HR, Kariyawasam SP, Tang H. Tissue Reaction to implanted root-end filling material of guinea in the tibia and mandibulia of guinea pigs. **J Endod.** 1998; (24)7: 468-71.
- 48- Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of Mineral Trioxide Aggregate. **J Endod** 1999; (25)3: 197-05.

49- Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short term capping experiments. **Int Endod J.** 2002; (35)3: 245-54.

50- Yoshimire Y, Ono M, Akifumi A. In vitro Comparision of the Bio compatibility of Mineral Tríoxide Aggregate, 4META/MMA-TBB rESIN, and Intermediate Restorative Material as Root-end-Filling Materials, **J Endod.** 2007; (33)9:1066-69.

ANEXOS



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 163/11 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 070/11

Projeto Pesquisa: "Avaliação da resposta inflamatória a materiais obturadores endodônticos, através de implantes infraósseos em guinea pig segundo metodologia da federação dentária internacional e estudo in vitro da citotoxicidade celular".

Pesquisador Responsável: Cássio José Alves de Sousa

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 19 de outubro de 2011

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Presidente da CEUA/UFU